

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUSTAVO MARQUESINE PAUL

ANÁLISE QUALITATIVA DO DEPÓSITO DE COLÁGENO EM SUTURA DE BEXIGA DE
RATOS TRATADOS COM A ASSOCIAÇÃO TACROLIMUS E MICOFENOLATO-MOFETIL

CURITIBA

2011

GUSTAVO MARQUESINE PAUL

ANÁLISE QUALITATIVA DO DEPÓSITO DE COLÁGENO EM SUTURA DE BEXIGA DE
RATOS TRATADOS COM A ASSOCIAÇÃO TACROLIMUS E MICOFENOLATO-MOFETIL

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Professor Doutor Renato Tâmbara Filho.

Co-orientador: Doutor João Carlos Domingues Repka.

Coordenador: Professor Doutor Antônio Carlos Ligocki Campos

CURITIBA

2011

Dedico este trabalho aos meus pais Eneida e Afonso que me deram a oportunidade do estudo, aos meus avós maternos João Marchesini (*in memoriam*) e Dirce pelo suporte familiar e à minha noiva e futura esposa Larissa Bollmann pelo carinho, apoio e compreensão dispensados.

AGRADECIMENTOS

Ao Orientador, PROF. DR. RENATO TÂMBARA FILHO, exemplo de dedicação à formação acadêmica, por ter viabilizado a integração entre a pesquisa, realizada no Hospital Angelina Caron, e a pós-graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR.

Ao Co-orientador DR. JOÃO CARLOS DOMINGUES REPKA pelo constante incentivo à pesquisa, viabilização de pesquisas e amizade fraterna, desde os tempos de faculdade.

Ao Coordenador da Pós-Graduação do Departamento de Cirurgia, PROF. DR. ANTONIO CARLOS LIGOCKI CAMPOS, pela oportunidade de alcançar esta titulação.

Aos Professores e Médicos do SERVIÇO DE UROLOGIA DO HC-UFPR, especialmente ao PROF. DR. LUIZ CARLOS ROCHA, PROF. DR. LUIZ EDISON SLONGO, PROF. DR. LUIZ SÉRGIO DOS SANTOS, DR. MANOEL ANTÔNIO GUIMARÃES e PROF. DR. RENATO TÂMBARA FILHO, por minha formação profissional.

Aos meus colegas DR. MATHEUS MARTIN MACRI, DR. MARCO ANTÔNIO CARON FILHO, DR. MARCUS NORA THOMÉ GUIMARÃES E DR. BRUNO AZEVEDO do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital Angelina Caron pelo auxílio na execução do experimento.

Aos meus colegas urologistas militares e ex-militares do Exército Brasileiro, DR. ALEXANDRE CAVALHEIRO CAVALLI, DR. FREDERICO MARCELO COELHO, DR. MARCELO ARANHA E DR. RAPHAEL FALKENBACK VON LINSINGEN pelo companheirismo e amizade diários.

Agradeço à PROFESSORA IZOLDA BOLLMANN pela revisão ortográfica.

Agradeço à BIBLIOTECÁRIA ÁUREA COSTIN pela revisão das referências bibliográficas

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e divulgação deste trabalho.

Agradeço a Deus por me dar o dom da vida e a oportunidade de exercer tão sublime profissão com ética e amor.

“Se você não quer ser esquecido quando morrer, escreva coisas que valham a pena serem lidas ou faça coisas que valham a pena escrever a respeito.”

Benjamin Franklin

RESUMO

Introdução: Dentre as principais complicações cirúrgicas dos transplantes renais destacam-se a ocorrência de fístulas urinárias que, apesar de agudamente não colocarem em risco a viabilidade do enxerto, aumentam sua morbidade pelo aumento do tempo de internamento e da necessidade de reintervenções cirúrgicas. Na cicatrização tecidual, especial atenção deve ser dada a produção de colágeno e de seus subtipos que são elementos fundamentais na arquitetura e na resistência do tecido em cicatrização. **Objetivo:** Avaliar a síntese de colágeno maduro e imaturo em sutura de bexiga de ratos tratados com a associação dos imunossupressores tacrolimus e micofenolato mofetil no período de 15 dias. Avaliar alterações da função renal e função hepática na vigência de tais imunossupressores. **Material e Método:** Utilizaram-se 30 ratos machos da linhagem Wistar que foram divididos em 3 grupos de dez animais cada, grupo controle, grupo simulação e grupo experimento. Todos os animais foram submetidos a procedimento anestésico e cirúrgico com laparotomia mediana e cistotomia seguida de cistorrafia padronizada com fio de PDS 5-0, em dois planos. No pós-operatório, os animais do grupo controle não receberam qualquer tipo de tratamento; os animais do grupo simulação receberam por via oral e via subcutânea solução salina isotônica, e os animais do grupo experimento receberam as drogas tacrolimus por via subcutânea, na dose de 0,1mg/kg/dia e micofenolato mofetil por via oral, na dose de 20mg/kg/dia pelo período de 15 dias. Ao final de 15 dias, coletaram-se amostras sanguíneas de tacrolimus, uréia, creatinina, bilirrubinas e transaminases (TGO e TGP) e eutanásia dos animais, seguido de cistectomia total com envio das peças cirúrgicas para mensuração quantitativa de colágeno maduro e imaturo da região da cistorrafia pela técnica do picrossírius red. **Resultados:** Observou-se aumento na produção de colágeno maduro nos animais do grupo controle e simulação em relação ao grupo experimento onde predominou de forma absoluta a presença de colágeno imaturo. A produção de colágeno total não sofreu alteração entre os diferentes grupos. Quanto à função renal e hepática, não observou-se diferença estatística entre os grupos analisados. **Conclusões:** Associação dos imunossupressores tacrolimus e micofenolato mofetil altera a produção qualitativa de colágeno, predominando o colágeno imaturo, em animais ao final de 15 dias. A mesma associação de drogas não altera a função renal nem hepática dos animais, nas doses utilizadas.

Palavras-chave: Cicatrização de feridas; Imunossupressão; Colágeno; Urotélio.

ABSTRACT

Introduction: Among the major surgical complications of kidney transplantation there is the occurrence of urinary fistulas, which acutely while not jeopardizing the viability of the graft, contributes negatively to increased morbidity by increasing the length of hospitalization and the need of re-surgery. In tissue healing, special attention should be given to production of collagen and its subtypes that are fundamental elements in the architecture and strength of healing tissue. **Objective:** Evaluate the synthesis of mature and immature collagen in suture of bladder of rats treated with the combination of immunosuppressive drugs tacrolimus and mycophenolate mofetil within 15 days. Evaluate changes in kidney and liver function in the presence of them. **Material and Method:** We used 30 male Wistar rats which were divided into three groups of ten animals each one: control group, simulation group and experimental group. All animals underwent anesthesia and laparotomy for the surgical cystotomy followed by cystorrhaphy standard wired PDS 5-0, in two planes. At post-operative, the control group received no treatment; animals in the simulation group received orally and subcutaneous isotonic saline solution, and the experimental group received the drugs tacrolimus by subcutaneous at dose 0,1mg/kg/day and mycophenolate mofetil orally at dose 20mg/kg/day and for a period of 15 days. At the end of 15 days blood samples were collected for tacrolimus, urea, creatinine, bilirubin and transaminases (AST and ALT) and it was done euthanasia of animals, followed by total cystectomy with surgical delivery of parts for quantitative measurement of mature and immature collagen in the region of the cystorrhaphy by picrosirius red technique. **Results:** It was observed increase in the production of mature collagen in the control group and simulation group in relation to the experimental group, where there were more presence of immature collagen. Kidney and liver function, show no statistical difference between groups. **Conclusions:** Association of immunosuppressive drugs tacrolimus and mycophenolate mofetil qualitatively alters the production of collagen, with predominance of collagen immature, in animals after 15 days. The same combination of drugs does not alter kidney or liver function of animals within used doses.

Keywords: Wound healing; Immunosuppression; Collagen; Urothelium.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 1	- ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ANIMAIS	28
FIGURA 1	- INÍCIO DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO COM LAPAROTOMIA PADRONIZADA	31
FIGURA 2	- REPARO DA BEXIGA SEGUIDO DE CISTOTOMIA PADRONIZADA	31
FIGURA 3	- CISTORRAFIA EM DOIS PLANOS COM PDS 5-0	32
FIGURA 4	- ASPECTO FINAL DA FERIDA OPERATÓRIA	32
FIGURA 5	- MICROSCÓPIO ÓPTICO OLYMPUS®, ACOPLADO A CÂMERA SONY® E COMPUTADOR PENTIUM.....	36
FIGURA 6	- CORTES HISTOLÓGICOS CORADOS PELO MÉTODO SIRIUS RED F3BA	47
FIGURA 7	- MAIOR FORMAÇÃO DE MATRIZ CALCULOSA NA BEXIGA DOS RATOS DO GRUPO EXPERIMENTO QUE SIMULAÇÃO...	48

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	- DOSAGENS SÉRICAS DE TACROLIMUS	38
GRÁFICO 2	- MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DAS DOSAGENS DE UREIA..	39
GRÁFICO 3	- MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DAS DOSAGENS DE CREATININA	40
GRÁFICO 4	- MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DAS DOSAGENS DE BILIRRUBINA TOTAL	41
GRÁFICO 5	- MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DAS DOSAGENS DE TGP....	42
GRÁFICO 6	- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DAS DOSAGENS DE TGO	43
GRÁFICO 7	- MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DAS ÁREAS DE COLÁGENO TOTAL	44
GRÁFICO 8	- MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DAS DENSIDADES DE COLÁGENO MADURO	45
GRÁFICO 9	- MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DAS DENSIDADES DE COLÁGENO IMATURO	46
GRÁFICO 10	- MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DAS DENSIDADES DE COLÁGENO MADURO E IMATURO.....	47

LISTA DE SIGLAS

CEPA	- Comitê de Ética e Pesquisa em Animais
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
FDA	- <i>Food and drug association</i> (vigilância sanitária dos Estados Unidos da América)
HAC	- Hospital e Maternidade Angelina Caron
IL-2	- Interleucina dois
IL-3	- Interleucina três
IL-4	- Interleucina quatro
IMPDH	- Enzima inosina monofosfato desidrogenase
INF γ	- Interferon γ
MMF	- Micofenolato mofetil
MPA	- Ácido micofenólico
PCS	- Coloração de <i>picrossirius red F3BA</i>
RNA	- Ácido ribonucléico
RS-61443	- Pró-droga semissintética éster morfolinoetil
TGF- β	- Fator de crescimento tipo beta
TNF- α	- Fator de necrose tecidual alfa
UFPR	- Universidade Federal do Paraná

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>ad libitum</i>	- Expressão em latim de “à vontade”
Amp.	- Ampola
AZA	- Azatioprina
CNI	- Inibidores da Calcineurina
Co	- <i>Corporation</i> (corporação em inglês)
ed.	- <i>Edition</i> (edição em inglês)
<i>et al.</i>	- <i>et alli</i> (e outros)
http	- <i>HyperText Transfer Protocol</i>
IMC	- Índice de massa corporal
MEIA	- Método imunoenzimático com micropartículas
N	- Número de
n.	- Número
p.	- Página(s)
PDS	- Fio de polidioxanona
SF	- Solução salina isotônica a 0,9%
SP	- Estado de São Paulo
SWTC	- <i>South West Transplant Centre</i>
TGO	- Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	- Transaminase glutâmico-pirúvica
UNIFESP	- Universidade Federal de São Paulo
v.	- Volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	13
1.2	OBJETIVOS DO ESTUDO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	CICATRIZAÇÃO E TIPOS DE COLÁGENO.....	15
2.1.1	Tipos de colágeno e o <i>Picrosirius red</i>	17
2.2	IMUNOSSUPRESSÃO.....	18
2.2.1	Tacrolimus.....	20
2.2.2	Micofenolato mofetil	21
2.2.3	Cicatrização e imunossupressão.....	22
2.3	FUNÇÃO RENAL, FUNÇÃO HEPÁTICA E IMUNOSSUPRESSÃO.....	24
3	MATERIAL E MÉTODO.....	28
3.1	DESCRIÇÃO DA AMOSTRA E ORGANIZAÇÃO DOS GUPOS DE ESTUDO.....	28
3.2	NORMATIZAÇÕES APLICADAS	29
3.3	AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO.....	29
3.4	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	30
3.5	TRATAMENTOS	33
3.6	COLETA DAS AMOSTRAS	34
3.7	AVALIAÇÕES.....	34
3.7.1	Avaliações Bioquímicas.....	34
3.7.2	Avaliações Histopatológicas.....	35
3.7.3	Análise Estatística	36
4	RESULTADOS.....	38
4.1	AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS	38
4.1.1	Dosagens de tacrolimus	38
4.1.2	Dosagens de ureia	39
4.1.3	Dosagens de creatinina.....	40
4.1.4	Dosagens de bilirrubina total	41
4.1.5	Dosagens de transaminase glutâmico-pirúvica	42
4.1.6	Dosagens de transaminase glutâmico-oxalacética	43
4.2	AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS	44
4.2.1	Avaliação histométrica das áreas de colágeno total.....	44
4.2.3	Avaliação histométrica das áreas de colágeno tipo I.....	45

4.2.3	Avaliação histométrica das áreas de colágeno tipo III.....	46
5	DISCUSSÃO	50
6	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS.....	59
	DOCUMENTOS CONSULTADOS.....	64
	APÊNDICE 1 - RESULTADOS DAS DOSAGENS DE TACROLIMUS.....	66
	APÊNDICE 2 - RESULTADOS DAS DOSAGENS DE UREIA.....	67
	APÊNDICE 3 - RESULTADOS DAS DOSAGENS DE CREATININA.....	68
	APÊNDICE 4 - RESULTADOS DAS DOSAGENS DE BILIRRUBINA	
	TOTAL.....	69
	APÊNDICE 5 - RESULTADOS DAS DOSAGENS DE TRANSAMINASES	
	GLUTÂMICO-PIRÚVICA.....	70
	APÊNDICE 6 - RESULTADOS DAS DOSAGENS DE TRANSAMINASES	
	GLUTÂMICO-OXALACÉTICA.....	71
	APÊNDICE 7 - AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA DA ÁREA DE COLÁGENO	
	TOTAL.....	72
	APÊNDICE 8 - AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA PORCENTUAIS DE DENSIDADES	
	DE COLÁGENO MADURO.....	73
	APÊNDICE 9 - AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA PORCENTUAIS DE DENSIDADES	
	DE COLÁGENO IMATURO.....	74
ANEXO	PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA EM	
	ANIMAIS.....	76

01 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Complicações cirúrgicas de transplantes renais são bem conhecidas e descritas na literatura. Dentre essas complicações, estão as trombooses, tanto arterial quanto venosa, fragilidade e estenose ureteral. As duas primeiras complicações são as mais discutidas, especialmente, por colocar em risco iminente a viabilidade do enxerto. As complicações urológicas, apesar de não afetarem agudamente a mortalidade e a sobrevida do enxerto, também têm a sua importância, tendo em vista o aumento da morbidade que trazem consigo, o aumento do tempo de internação e a necessidade de re-intervenções cirúrgicas, trazendo a médio e longo prazo risco para o enxerto (MAEKISALO *et al.*, 1997).

A incidência de complicações urológicas, após transplantes renais, variam de 2,5% a 14,7% dependendo em parte dos critérios usados para definição desses problemas (HUMAR *et al.*, 2001). As principais complicações urológicas envolvidas nos transplantes tanto renais quanto nos renopancreáticos são as estenoses ureterais e fístulas urinárias (TAMBARA FILHO *et al.*, 1998). Dentre essas complicações, a maioria são fístulas urinárias, sendo que 80% delas são precoces, ou seja, nos primeiros 90 dias de pós-operatório (AGUERA *et al.*, 1994; NICOLUZZI, 2003). Para se entender melhor tal fato, é de fundamental importância estudarmos os passos da cicatrização tecidual.

Após uma agressão tissular, dá-se início o processo de restauração do tecido por uma série de processos celulares, fisiológicos e bioquímicos que ocorrem simultaneamente e de forma integrada. Witte e Barbul, em 1997, simplificadamente, dividiram didaticamente a cicatrização em três fases distintas, porém relacionadas: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de maturação. Cada uma destas fases desempenha papel importante na cicatrização (WITTE; BARBUL; 1997). Destaque especial recebe o colágeno, que é a principal proteína encontrada no tecido conjuntivo. O colágeno é o principal responsável pela força mecânica tecidual.

Individualmente, diferentes órgãos sofrem reparos tissulares com variações. A bexiga apresenta características diferentes de regeneração que o trato gastrointestinal com taxa de deposição de colágeno e de regeneração final diferentes (EDLICH; 1985). Dentre os diversos fatores que podem afetar a cicatrização de feridas, a imunossupressão aparece como fator importante afetando negativamente

o processo cicatricial (SCHAFFER *et al.*, 1998; GOLDFARB, 2002). Este fato, aliado ao crescente número de transplantes em todo o mundo, cuja técnica cirúrgica envolve ao menos uma anastomose urotelial (uretero-vesical), despertou o interesse em se idealizar esta pesquisa, com a finalidade de se avaliar as eventuais interferências da imunossupressão na cicatrização urotelial, pelo depósito de colágeno.

1.1 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Tendo por base os altos índices de fístulas urinárias precoces em pacientes submetidos a algum tipo de transplante renal concomitante a imunossupressão, cujas drogas têm ação voltada às células precursoras de atividade imunológica e atividade de reparo tissular, surge o possível questionamento da influência das drogas imunossupressoras no processo cicatricial, tanto por reduzir a atividade das células inflamatórias quanto pelas células proliferativas. Um possível parâmetro mensurável da cicatrização é o colágeno, proteína chave no processo de remodelação tecidual. O colágeno em análise conjunta com seus subtipos são fatores mensuráveis da evolução e maturidade da estruturação da cicatriz e do tecido cicatricial residual.

1.2 OBJETIVOS DO ESTUDO

Este estudo experimental, desenvolvido com ratos Wistar tem por objetivos:

- 1) Verificar os efeitos da associação do Tacrolimus e Micofenolato Mofetil sobre as sínteses de colágeno tipos I e III na cicatrização de suturas de bexiga.
- 2) Verificar os efeitos da associação dos imunossupressores Tacrolimus e Micofenolato Mofetil nas funções renal e hepática nos animais.

02 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CICATRIZAÇÃO E TIPOS DE COLÁGENO

A cicatrização de feridas consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a re-pavimentação e reconstrução do tecido lesado. É um evento dinâmico e harmonioso com o objetivo final de restauração tissular. Diferentemente de Witte e Barbul (WITTE; BARBUL; 1997), a maioria dos autores classifica a cicatrização em cinco fases principais, sendo elas: coagulação, inflamação, proliferação, contração da ferida e remodelação. As cinco fases não são fatos isolados e acontecem de forma simultânea, começando uma antes mesmo de acabar a outra (KASISKE; 2006).

Na fase de coagulação, ocorre liberação plaquetária de substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores de crescimento e proteases que irão desencadear as outras fases. A formação do coágulo não serve apenas para coaptar as bordas das feridas, mas também para cruzar a fibronectina, oferecendo uma matriz provisória, em que os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos ingressam na ferida.

Na fase inflamatória, ocorre a chegada de polimorfonucleares à região de injúria tecidual. São os macrófagos as células mais importantes desta fase e responsáveis pela fagocitose bacteriana, desbridamento de corpos estranhos e direcionamento do desenvolvimento do tecido de granulação. Ao final da fase inflamatória, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais iniciam a produção do arcabouço estrutural para a reestruturação tecidual.

A fase proliferativa é quando ocorre o fechamento propriamente dito da ferida. Ocorre fibroplasia e formação da matriz, os fibroblastos e células inflamatórias produzirão fibronectina, glicosaminoglicanos e o colágeno, elementos estruturais fundamentais na cicatrização. Em seguida, ocorre maior produção angiogênica da qual dependerá maior aporte de oxigênio e nutrientes para a cicatrização.

Finalmente, a fase de contração da ferida, que se faz de forma centrípeta das bordas da ferida, e a fase de remodelação da matriz e do colágeno com

melhoria dos componentes de suas fibras permitindo maior conexão e força da cicatriz (KASISKE; 2006).

Diversos autores já relataram a importância da abundância do colágeno na submucosa do tecido para a maior resistência mecânica do tecido cicatricial. Independentemente do tecido lesado, o colágeno é o componente mais importante na reparação de tecidos (THORNTON; BARBUL; 1997), sendo a proteína mais abundante do tecido conectivo na cicatrização. Já foram descritos mais de 19 tipos de colágenos e cada subtipo irá determinar a sua função e as suas características físicas.

O colágeno é o maior componente estrutural da matriz extracelular e representa aproximadamente 25% da proteína corporal total. As moléculas de colágeno se consistem em três cadeias de polipeptídeos (cadeias- α) idênticas ou similares, as quais formam uma hélice tripla com os aminoácidos glicina, alanina, lisina, prolina, hidroxilisina e hidroxiprolina.

A prolilhidroxilase transforma a prolina em hidroxiprolina, que passa a ser um aminoácido exclusivo do colágeno. A hidroxiprolina está presente em concentrações elevadas no colágeno, sendo indispensável para a estabilização da tríplice hélice da proteína. Três subtipos de colágeno (I, III e V) são identificados durante o processo cicatricial epitelial. Os colágenos I e III atingem proporções mais significativas e a relação entre eles têm importância maior no estudo da cicatrização anastomótica (BRASKÉN; 2001; JUNQUEIRA; MONTES; SANCHEZ, 1982).

O colágeno do tipo I é o mais frequente, sendo sintetizado pelos fibroblastos, é predominante em ossos e tendões. O colágeno tipo III é mais comumente encontrado em tecidos moles, tais como vasos sanguíneos, derme e fáscia. A derme íntegra tem cerca de 80% de colágeno do tipo I e 20% de colágeno tipo III. Já no tecido de granulação a quantidade de colágeno do tipo III (também conhecido como colágeno imaturo) é maior. Uma das características físicas que distinguem os colágenos do tipo I e do tipo III é a forma de entrelaçamento de suas fibras. As fibras do colágeno tipo I são mais bem entrelaçadas e compactadas contrastando com as fibras do colágeno tipo III que têm pouco entrelaçamento entre as suas fibras proporcionando menos força tênsil ao tecido cicatricial (FERREIRA, 2004). Corroborando com esses achados, Koruda e Rolandelli em 1990, em artigo de

revisão sobre estudos experimentais de cicatrização de anastomoses colônicas em animais, citam que tanto a quantidade como a qualidade do colágeno, representada pela sua propriedade de entrelaçamento, determinam maior ou menor resistência mecânica da anastomose. Assim, a resistência de uma sutura poderia ser melhor definida pela determinação da proporcionalidade da presença de colágeno imaturo e de colágeno maduro (KORUDA; ROLANDELLI, 1990).

As anastomoses epiteliais perdem 72% a 95% da sua força tecidual inicial, durante os três primeiros dias do processo cicatricial, quando há atividade mais intensa da collagenase (HÖGSTRÖM *et al.*, 1985; JIBORN; AHONEN; ZEDERFELDT; 1980). Após esse período inicial, a anastomose ganha força acompanhando progressivo depósito de colágeno na área cicatricial. Entretanto, as características qualitativas do colágeno depositado são mais importantes para o suporte estrutural da anastomose do que sua concentração tecidual (HENDRICKS; MASTBOOM, 1990). Outro dado importante é o de que ao décimo quinto dia é quando ocorre a deposição máxima de colágeno no tecido em cicatrização.

Diversos parâmetros histológicos permitem avaliar a presença e a estrutura dos componentes microscópicos envolvidos no processo de cicatrização. Estes parâmetros são muito empregados em estudos experimentais, porém são subjetivos e sujeitos a erros de interpretação. Assim, é importante utilizar métodos que possibilitem avaliar dados passíveis de quantificação uniforme para que sejam possíveis realizar comparações e adequada avaliação do processo de cicatrização.

2.1.1 Tipos de colágeno e o *Picrosirius Red*

Sweat, Puchtler e Rosenthal, em 1964, recomendaram o *picrosirius red* F3BA (PCS) para coloração do colágeno, utilizando a técnica de ácido pícrico. Essa técnica se destaca pela maior seletividade para tecido conjuntivo e por ser mais adequada na leitura microscópica por luz polarizada (SWEAT; PUCHTLER; ROSENTHAL, 1964). Em 1979, Junqueira, Bignolas e Brentani confirmaram, em seus experimentos, que a coloração com PCS é um procedimento específico para o colágeno, uma vez que não cora fortemente as glicoproteínas. Esses mesmos autores sugeriram que há aumento de, pelo menos, 700% na intensidade da luz,

devido à birrefringência do colágeno corado pelo PCS, quando comparado com controles (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979). Essa característica é responsável pelas imagens claras que permitem a observação acurada do colágeno em diferentes tecidos (SWEAT; PUCHTLER; ROSENTHAL, 1964).

O espectro das diferentes cores de polarização obtidas depois da coloração com PCS é útil na diferenciação entre os vários tipos de colágeno. A diferenciação de cores de polarização se deve mais à espessura das fibras do que à natureza delas (JUNQUEIRA; MONTES; SANCHEZ, 1982). Da mesma forma, Dayan, Hiss e Hirsberg em 1989, comparam vários tipos de fibras colágenas purificadas, de espessuras diferentes, pelo método PCS. Esses autores evidenciaram que o entrelaçamento e o alinhamento entre as moléculas, e não apenas sua espessura, constituíram o fator mais importante para determinar o padrão de birrefringência. Na observação com luz polarizada, as fibras com maior entrelaçamento e maior espessura apresentaram coloração laranja-avermelhada e foram denominadas colágeno do tipo I (maduro). As fibras mais afiladas e menos entrelaçadas apresentaram coloração esverdeada e foram denominadas colágeno tipo III (imaturo) (DAYAN *et al.*, 1989). O cálculo da porcentagem das fibras, classificadas em maduras ou imaturas de acordo com a sua coloração, permite avaliação qualitativa de fibras colágenas, podendo ser utilizado em estudos de cicatrização de anastomoses (RABAU *et al.*, 1998; SCHMITZ, 2006).

2.2 IMUNOSSUPRESSÃO

A imunossupressão clínica foi iniciada no começo dos anos cinquenta com o uso de glicocorticóides associados à azatioprina e globulinas antilinfocitárias. Permaneceram como as principais drogas imunossupressoras até o começo dos anos 80, quando a ciclosporina foi introduzida no mercado americano. A partir dos anos 90, agentes químicos como o Tacrolimus e o Micofenolato-mofetil foram comercializados. Novas drogas estão sendo estudadas e têm sido utilizadas, sendo elas o Sirolimus, Mizoribina, Brequinar, Gusperimus e o Leflunomide (AGUERA *et al.*, 1994). Com uma gama cada vez maior de imunossupressores colocados à disposição no mercado, muito tem sido estudado a respeito de qual seria o melhor

esquema de imunossupressão para o transplante renal. Conseguindo cada vez menores taxas de rejeição com diferentes combinações de drogas imunossupressoras, a importância da segurança e da tolerabilidade tem se tornado cada vez mais importante, especialmente, com relação à preservação da função do enxerto e redução dos fatores de risco cardiovascular, diretamente associados com a sobrevida do enxerto e do paciente (ABBUD FILHO; RAMALHO, 1997).

As drogas imunossupressoras e os regimes de imunossupressão são empregados para evitar a rejeição aguda. Os melhores resultados, com maior impacto na rejeição foram observados após a introdução dos inibidores da calcineurina, inicialmente com a ciclosporina e posteriormente o tacrolimus como imunossupressor base. As chamadas terapias adjuvantes demonstraram uma redução ainda maior dos índices de rejeição aguda, com a azatioprina e mais recentemente com o micofenolato mofetil e o sirolimus. Sampaio e colaboradores, em 2007, do grupo de transplante renal do Hospital do Rim e Hipertensão da Unifesp - SP, publicaram um estudo prospectivo e randomizado comparando esquemas de imunossupressão baseados no Tacrolimus, usado em associação com o Micofenolato-mofetil ou com o Sirolimus, observando vantagem com o micofenolato no que diz respeito à preservação da função renal (SAMPAIO *et al.*, 2008).

Em protocolos internacionais de imunossupressão do *South West Transplant Centre* (SWTC), de 2006, observa-se que não há consenso em um regime de imunossupressão perfeito, enfatizando a grande variação nos protocolos de imunossupressão entre diferentes centros na Europa e nos Estados Unidos da América. Estudos têm comparado o tacrolimus e a ciclosporina, concluindo não haver diferença estatística na sobrevida do paciente nem na sobrevida do enxerto. Porém, esses mesmos artigos mostram uma tendência à maior sobrevida dos pacientes com tacrolimus. O SWTC também refere que a combinação tacrolimus e micofenolato-mofetil é particularmente potente pela biodisponibilidade do micofenolato-mofetil ser maior com o tacrolimus comparado à ciclosporina. Em geral, o uso do tacrolimus e do micofenolato-mofetil está aumentando, o uso da ciclosporina está decaindo, e a azatioprina não é mais usada nos Estados Unidos. O sirolimus é muito usado na Europa, porém seu uso nos Estados Unidos aparece em

declínio sendo utilizado em menos de 10% dos casos (SOUTH WEST TRANSPLANT CENTRE (SWTC, 2006).

2.2.1 Tacrolimus

O tacrolimus é um macrolídeo policíclico produzido pelo fungo *Streptomyces tsukubaensis*, eficaz e com potente atividade imunossupressora *in vitro* e *in vivo*. Semelhante à ciclosporina, o tacrolimus inibe as vias bioquímicas intracelulares dependentes do íon cálcio (Ca^{2+}) com inibição da calcineurina e de suas interações com o receptor citoplasmático. Inibe também os genes precoces de ativação das células T bloqueando a expressão do RNA mensageiro de várias citocinas (IL-2, IL-3, IL-4, interferon gama) (AGUERA *et al.*, 1994).

O tacrolimus tem ação imunossupressiva semelhante à ciclosporina, porém com um potencial de ação superior, tanto em esquemas de manutenção como de resgate em transplantes de órgãos sólidos. Seus efeitos colaterais mais importantes são a hipertensão arterial, efeito diabetogênico, nefro e neurotoxicidade. É importante a monitorização sérica dessa droga, tanto para a confirmação da faixa terapêutica quanto para a exclusão da dose tóxica. O método imunoenzimático com micropartículas (MEIA) tem significativa vantagem quando comparado ao método imunoenzimático simples nesse tipo de detecção (WINKLER *et al.*, 1994). O tacrolimus em comparação com a ciclosporina C mostrou-se superior, sendo imunossupressão padrão em transplantes de fígado e rins. Outras situações em que o tacrolimus ganhou bastante espaço incluem transplantes de coração, pulmão, pâncreas e intestino (PLOSKE; FOSTER, 2000).

O tacrolimus é bem tolerado e associado a menores índices de hipertensão arterial, hiperlipidemia, gengivite e hiperplasia gengival que a ciclosporina. Também a função renal, avaliada pela creatinina sérica e taxa de filtração glomerular tem benefícios com relação à ciclosporina em *follow up* de 5 anos (SCOTT *et al.*, 2003).

O tacrolimus inibe a função imune celular que é fundamental para a cicatrização normal de feridas. O aporte tissular de células inflamatórias e a síntese de fatores de modulação tissulares de células mesenquimais sofrem redução de sua função com esse imunossupressor. Como consequência, a cicatrização fica

prejudicada. Efeitos concomitantes que podem explicar tal efeito são a redução do TGF- β (fator de crescimento beta) e o aumento da expressão de fatores inibidores de reparo tissular como o INF γ (interferon Y) e o TNF- α (fator de necrose tecidual alfa) (SCHAFFER *et al.*, 2005).

2.2.2 Micofenolato Mofetil

O micofenolato mofetil é um agente inibidor da síntese de nucleotídeos. O RS-61443 é a pró-droga semissintética éster morfolinoetil, também conhecida como micofenolato-mofetil (MMF) que, ativada por hidrólise, transforma-se em ácido micofenólico (MPA). Após a administração oral e absorção, o RS-61443 é convertido em MPA que, posteriormente, será metabolizado no fígado para a sua forma inativa. A regeneração da forma ativa (MPA) é feita pela enzima beta-glicuronidase que parece existir em concentrações elevadas em células ativadas T, B e macrófagos que talvez, por essa razão, sejam bastante sensíveis a essa droga. A droga tem ação na redução da síntese de nucleotídeos, reduzindo a síntese de purinas (ABBUD FILHO; RAMALHO, 1997). O uso do MMF reduz, significativamente, a incidência de episódios de rejeição, quando comparada à azatioprina. Os seus resultados analisados em conjunto indicam que, após o primeiro ano de transplante, há redução nos episódios de rejeição aguda e da perda do enxerto por razões imunológicas (AGUERA *et al.*, 1994).

O MMF, produto de um fungo *Penicillium*, originalmente isolado em 1886, tem ação antineoplásica, antiviral e antifúngica. O micofenolato mofetil impede a proliferação de linfócitos B por uma via inibitória da divisão celular. O principal objetivo para a adição de MMF aos regimes de imunossupressão é reduzir a frequência de rejeição aguda do enxerto renal. O MMF foi aprovado pelo FDA para a prevenção de rejeição aguda em transplante renais, em Junho de 1995 (MELE; HALLORAN, 2000).

O ácido micofenólico é um potente inibidor da enzima inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH), chave da via da biossíntese das purinas. A inibição na IMPDH bloqueia a síntese de nucleosídeos de guanossina, substratos para a síntese de DNA e RNA. Dessa forma, ocorre inibição da síntese de DNA e RNA, reduzindo a

proliferação celular. Linfócitos T e B dependem predominantemente dessa via de síntese de purinas para sua proliferação. Desse modo, a ação do micofenolato mofetil resulta numa potente inibição da atividade linfocitária (NORONHA *et al.*, 1997).

O mecanismo de ação do micofenolato mofetil é similar ao do sirolimus, combinando efeito imunossupressivo e antiproliferativo, que previne e reduz a deteriorização da função do enxerto por nefropatia crônica. Também o uso do micofenolato é associado à melhor função renal do enxerto e menor fator de risco cardiovascular (SAMPAIO *et al.*, 2008). Em uma revisão de vários esquemas de imunossupressão, Barbari relatou que, ao adicionar ao esquema imunossupressivo drogas como o micofenolato mofetil e o sirolimus, há um aumento na sobrevida média do enxerto, principalmente por reduzir a ocorrência de rejeição aguda e de nefropatia crônica. No entanto, os pacientes que recebem sirolimus em seu esquema de imunossupressão têm maiores riscos de desenvolvimento de hiperlipidemia, atraso de cicatrização, linfocite, artralgia e trombocitopenia (BARBARI; STEPHAN; MASRI, 2007).

2.2.3 Cicatrização e Imunossupressão

Agüera descreveu as complicações urológicas de 302 transplantes consecutivos, realizados em um período de 16 anos de 1976 até 1992 no Hospital Universitário da Faculdade de Medicina da Universidade de Navarra, Espanha. Nessa série, dos 302 pacientes transplantados, 33 pacientes evoluíram com complicações urológicas. Dentre essas complicações, 73% foram fístulas urinárias, e 27% foram estenoses ureterais. Outro dado importante dessa série, é que essas complicações foram, em 80%, complicações precoces (nos primeiros 90 dias de pós-operatório) (AGÜERA *et al.*, 1994). Corroborando com o estudo de Agüera, Nicoluzzi em 2003 relatou como principal complicação urológica também a ocorrência de fístulas urinárias precoces em 12,5% da sua casuística (NICOLUZZI *et al.*, 2003).

A primeira descrição do efeito deletério do tacrolimus no processo de cicatrização foi feito por Schaffer, em 1998. Nesse estudo, o autor encontrou que o tratamento de ratos com 2mg/kg por dia de tacrolimus prejudicou a cicatrização de

feridas em ratos, com redução da concentração local de óxido nítrico e a deposição de colágeno em dez dias de tratamento (SCHAFFER *et al.*, 1998).

Ao longo da sua história, os efeitos do tacrolimus vêm sendo estudados nos diversos tecidos. Kita, em 1999, estudou os efeitos do tacrolimus na cicatrização de intestino delgado (íleo) e cólon (reto) de ratos. Observou-se que a força tensional (pressão de ruptura da anastomose) de anastomoses em intestino grosso teve menor resistência em animais tratados com tacrolimus que aqueles tratados com solução salina isotônica. No entanto, quando estudado o mesmo fator em intestino delgado, não houve diferença entre os grupos tacrolimus e solução salina isotônica, ao final de sete dias de tratamento com a droga administrada por via intraperitoneal (KITA *et al.*, 1999).

Em 2002, Kiyama estudou os efeitos do tacrolimus em cicatrização aguda colônica em ratos, mostrando que o tacrolimus melhorou a cicatrização de anastomoses colônicas, refletida pelo aumento da pressão de ruptura de tecido colônico de anastomose de ratos, após 4 dias de tratamento. Entretanto, não se observou alteração significativa da deposição de colágeno tecidual (KIYAMA *et al.*, 2002).

Goldfarb, em 2002, relatou a experiência de 2013 transplantes, entre 1984 e 1998, com os imunossupressores ciclosporina, azatioprina e prednisona em transplantes intervivos e com doador cadáver, estudando complicações pós-operatórias. Nesse estudo, em 1997, trocou-se a azatioprina pelo micofenolato mofetil. Após a introdução do micofenolato mofetil, aumentou-se o fator de risco para hérnia incisional e deiscência fascial. Isso por seu efeito antiproliferativo, interferindo com a cicatrização do músculo e fáscia. Outros pesquisadores também relataram problemas com má cicatrização de feridas em receptores de transplante de MMF. Recomenda-se evitar MMF naqueles pacientes com alto risco de complicação da ferida operatória como na obesidade e em múltiplos procedimentos de reoperação (MEIER-KRIESCHE *et al.*, 1999). O uso do MMF é associado com um risco aumentado para complicações da ferida operatória (GOLDFARB, 2002).

Flachner, em 2003, estudou as complicações cirúrgicas em feridas operatórias, envolvendo diferentes esquemas de imunossupressão ao longo de quase dez anos de transplantes, em 513 pacientes. Comparando os esquemas 1 (micofenolato mofetil, sirolimus e prednisona) com o esquema 2 (ciclosporina,

micofenolato e prednisona com azatioprina) não se observou aumento das complicações. O único fator de risco para complicações cirúrgicas foi o índice de massa corporal, sendo que o IMC acima de 30 foi associado a maior número de complicações (FLECHNER *et al.*, 2003).

O tacrolimus em cartilagem articular da cabeça da mandíbula de ratos diminui significativamente o volume do osso trabecular e acarreta mudanças atróficas da cartilagem articular. Do ponto de vista imuno-histológico, revelou-se diminuição da proliferação e diferenciação de condrócitos na cartilagem articular com o tacrolimus em comparação com o grupo controle. A administração de tacrolimus inibe a proliferação e diferenciação celular (UENO *et al.*, 2004).

Schaffer e Fuchs, em 2005, estudaram os efeitos do tacrolimus na cicatrização de derme e de tecido intestinal. Nos seus resultados, os autores observaram diferentes efeitos. Nesse estudo, a administração de 2mg/kg de tacrolimus levou à redução da cicatrização da derme dos animais. Já no estudo da cicatrização de feridas intestinais não houve diferença nesses dados (SCHAFFER *et al.*, 2005). Ekici, em 2007, observou os efeitos da imunossupressão com sirolimus na cicatrização em sutura de bexiga de ratos e concluiu que o sirolimus afeta todas as etapas da cicatrização vesical, incluindo a diminuição do número de células inflamatórias, angiogênese e a proliferação de miofibroblastos, adiando o processo de cicatrização (EKICI *et al.*, 2007).

Em contrapartida, Gagliano, em 2008, não observou alteração na produção de colágenos tipo I e III, mesmo com altas doses de tacrolimus, na síntese dessa proteína em fibroblastos gengivais (GAGLIANO *et al.*, 2008).

2.3. FUNÇÃO RENAL, FUNÇÃO HEPÁTICA E IMUNOSSUPRESSÃO

Os imunossupressores, especialmente os inibidores da calcineurina como a ciclosporina e o tacrolimus, alteram a hemodinâmica glomerular. Resultado disso é a redução da filtração glomerular (GARCIA *et al.*, 2004). Os inibidores de calcineurina (CNI) são os principais fatores patogênicos para a disfunção renal em receptores de transplante de órgãos sólidos (PONTON *et al.*, 2010). O uso contínuo e em altas doses dessas drogas tem como limitação principal a nefrotoxicidade. Em estudo

comparativo entre as duas drogas, após duas semanas, concluiu-se que a ciclosporina afeta mais a hemodinâmica e a pressão arterial, predispondo mais o transplantado à falência renal. Embora os inibidores da calcineurina estejam associados a muitas formas de nefrotoxicidade, existem alguns precedentes na literatura associando à melhoria da função renal após a substituição da ciclosporina pelo tacrolimus (GARCIA *et al.*, 2004).

Estudos na literatura analisaram o impacto da combinação sirolimus e tacrolimus sobre a função renal. Em 2005, Andres e colaboradores estudaram receptores de transplante de ilhotas pancreáticas com, pelo menos, seis meses de acompanhamento, observando haver comprometimento da função renal em 60% dos pacientes, quando analisando a creatinina sérica e a albuminúria. Alguns subgrupos de pacientes apresentam maior risco de declínio da função renal, como o menor *clearance* de creatinina prévio, albuminúria e maior tempo prévio de transplante, com pior prognóstico (ANDRES *et al.*, 2005).

Inácio, em 2010, estudou a evolução do carcinosarcoma 256 de Walker em rim de ratos Wistar, tratados com o tacrolimus. Em seus resultados, observou que os animais portadores da neoplasia tratados com tacrolimus tiveram dosagens de creatinina e uréia significativamente maiores que aqueles não tratados com o imunossupressor (INACIO *et al.*, 2010).

Introdução de espécies de drogas imunossupressoras, como o micofenolato de mofetil (MMF), em esquemas de imunossupressão com base nos inibidores da calcineurina, pode permitir a suspensão ou a redução destas drogas no tratamento, melhorando a função renal. A aplicação de um protocolo de imunossupressão com MMF e de baixo nível CNI em receptores de transplante hepático com disfunção renal crônica foi associada com melhora ou normalização da creatinina, sem aumento do risco de rejeição (PONTON *et al.*, 2010). A conversão precoce alcança os melhores resultados. Resultados semelhantes foram observados por Barrera-pulido e Lai onde a disfunção renal causada pelos inibidores da calcineurina foi reduzida com a introdução do MMF e redução das dosagens de inibidores de calcineurina, sem prejuízo da imunossupressão nem aumento das taxas de rejeição (BARRERA-PULIDO *et al.*, 2010; LAI *et al.*, 2009).

A administração de micofenolato mofetil parece melhorar a depuração de creatinina em pacientes hipertensos, podendo melhorar a função renal desses

pacientes, indicando que, talvez, possa haver a influência do sistema imunológico na gênese de nefropatia hipertensiva (BOESEN *et al.*, 2010).

O uso do micofenolato mofetil, em transplantados renais, piora a sua função hepática refletida pelo aumento dos níveis séricos de bilirrubinas, TGO e TGP. A disfunção hepática é reduzida com a redução ou suspensão da droga (BALAL *et al.*, 2005). Os imunossupressores ciclosporina e tacrolimus, quando usados de forma isolada em transplante hepático, também parecem piorar a função hepática. A alternância entre esses dois imunossupressores não mostra melhora na disfunção. Porém, quando o micofenolato mofetil é introduzido no esquema imunossupressivo, pode-se reduzir a dosagem de inibidores da calcineurina, melhorando a função hepática do paciente (TANIAI *et al.*, 2008.).

3 MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA E ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO

Utilizaram-se 30 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar, com idades de 120 a 140 dias e pesos de $265,34 \pm 23,73$ gramas, provenientes do biotério da Universidade Federal do Paraná.

Os animais foram divididos em três grupos de 10, de acordo com os seguintes procedimentos:

QUADRO 1 - ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ANIMAIS

GRUPOS	N
CONTROLE (C) Ratos não tratados com SF ou imunossupressores, submetidos à laparotomia infra-umbilical, cistotomia, cistorrafia e laparorráfia.	10
SIMULAÇÃO (S) Ratos tratados com SF, submetidos à laparotomia infra-umbilical, cistotomia seguida de cistorrafia e laparorráfia.	10
EXPERIMENTO (E) Ratos tratados com imunossupressores (Micofenolato Mofetil e Tacrolimus), submetidos à laparotomia infra-umbilical, cistotomia seguida de cistorrafia e laparorráfia.	10

Para a realização da cistorrafia, utilizou-se fio polidioxanona (PDS-Ethicon®) 5-0 em dois planos

Os ratos foram separados em grupos de cinco, em caixas de polipropileno, adequadas para a espécie (COBEA), devidamente identificadas, e cada animal também identificado com marcas permanentes feitas na pelagem, com solução de ácido pícrico comercial a 10%. Foram mantidos em ambiente específico, com temperatura e umidade controladas sob ciclos de iluminação, automaticamente regulados a cada 12 horas. Receberam ração específica para a espécie (NUVILAB,

NUVITAL[®]) e água *ad libitum*. Os dejetos e as caixas dos animais eram substituídas a cada 48 horas.

3.2 NORMATIZAÇÕES APLICADAS

Foram observados os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, 2000), a Nomenclatura Anatômica proposta por Walker e Homberger em 1997 (WALKER; HOMBERGER, 1997) e as Normas para Apresentação de Trabalhos da Universidade Federal do Paraná (2007) (NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DE DOCUMENTOS CIENTÍFICOS. UFPR, 2007).

Este projeto foi aprovado em 28 de julho de 2008 pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais do Hospital e Maternidade Angelina Caron, conforme parecer nº 21/08 CEPA/HAC (anexo 1).

3.3 AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO

Após o recebimento, os animais foram submetidos ao seguinte protocolo:

- Triagem por meio de exames parasitológicos de fezes e inspeção da pelagem para investigação de ectoparasitas, sendo descartados os animais portadores.
- Alojamento em caixas de prolipropileno desinfetadas com Hipoclorito de Sódio a 1%, contendo sepilho esterilizado, substituídos a cada 48 horas.
- Alocação em sala específica para animais de laboratório, com temperatura controlada entre 19 a 23°C, sob ciclos de iluminação automaticamente regulados a cada 12 horas, com exaustão forçada.
- Receberam ração específica para a espécie (Nuvilab - Nuvital[®]) e água *ad libitum*.
- Mantidos em período de dez dias para adaptação.

3.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Pré-operatório

Todos os ratos foram submetidos a jejum de 12 horas.

Peroperatório

Os ratos foram pesados e submetidos à sedação por inalação de halotano (Tanohalo-Cristália[®]) em circuito fechado e recebiam anestesia por injeção intramuscular com cloridrato de cetamina (Ketamin-Cristalia[®]) na dose de 100mg/kg, associada a 10mg/kg de cloridrato de xilasina (Xilazin-Syntec[®]) (BACELAR JR *et al.*, 1999).

Em seguida, após evidenciação da indução anestésica, procedia-se à tricotomia ampla do abdome e, fixados em decúbito dorsal, tinham sua parede abdominal anterior lavada com solução de povidine degermante, antissépsia com povidine tópico e colocavam-se campos cirúrgicos fenestrados esterilizados.

Prosseguia-se com a laparotomia mediana longitudinal, com quatro centímetros de extensão, aberta por planos em sua sequência: pele, tecido celular subcutâneo, músculo reto anterior do abdome e peritônio (figura 1).

Após inventário da cavidade, era isolada a bexiga urinária do animal a qual era submetida à cistotomia longitudinal de três centímetros na parede vesical anterior com lâmina de bisturi número 15, complementada com tesoura de íris (figura 2).

Após a cistotomia padronizada, o defeito era fechado com fio cinco zeros (5-0) de polidioxanona (PDS-Ethicon[®]) em dois planos, sendo o primeiro plano, musculo-mucoso, com pontos contínuos de chuleio simples e o segundo plano, sero-muscular, com pontos separados (figura 3).

A seguir, procedia-se o fechamento da cavidade abdominal com sutura contínua com fio poliglactina 910 3-0 (Vycril - Ethicon[®]), e o fechamento da pele com pontos simples de nylon incolor 3-0 (Ethicon[®]) (figura 4).

Após o procedimento, realizava-se curativo da ferida abdominal com fita adesiva de micropore[®] e os ratos eram devolvidos às suas gaiolas para recuperação pós-anestésica.

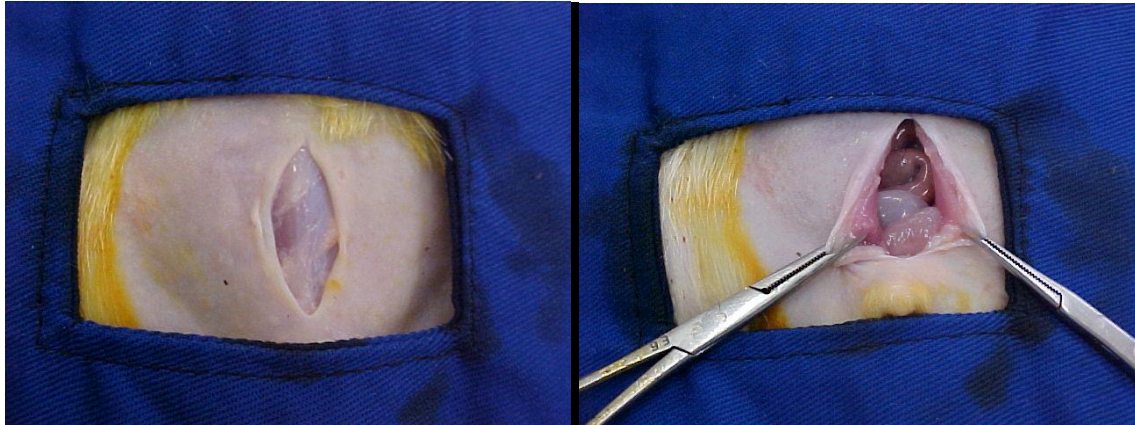


FIGURA 1 – INÍCIO DO PROCEDIMENTO CIRURGICO COM LAPAROTOMIA PADRONIZADA



FIGURA 2 – PROCEDIMENTO CIRÚRGICO - REPARO DA BEXIGA SEGUIDO DE CISTOTOMIA PADRONIZADA.

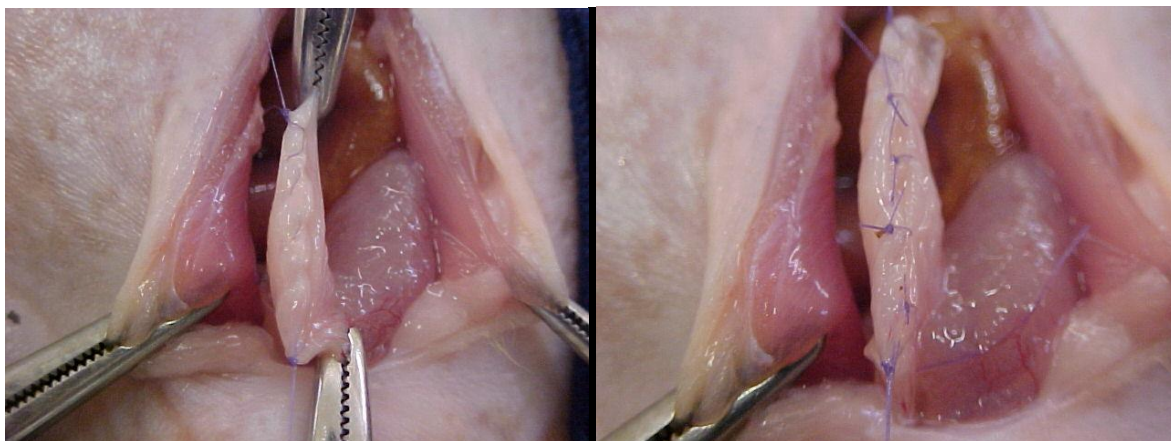


FIGURA 3 - PROCEDIMENTO CIRÚRGICO – CISTORRAFIA EM DOIS PLANOS (CHULEIO CONTÍNUO E TOTAL) COM PDS (5-0)



FIGURA 4 – PROCEDIMENTO CIRÚRGICO – ASPECTO FINAL DA FERIDA OPERATÓRIA

Pós-operatório

Foi administrado dipirona por via subcutânea, na dose de 20mg/kg e os animais mantidos sob aquecimento até a recuperação anestésica. A seguir, os ratos

eram relocados de forma aleatória em caixas devidamente identificadas e passaram a receber ração e água *ad libitum* até o décimo quinto dia de evolução pós-cirúrgica.

Os animais receberam os tratamentos previstos, sendo que os ratos do grupo experimento receberam diariamente as drogas imunossupressivas tacrolimus e micofenolato mofetil, e os animais do grupo simulação solução salina isotônica. Para tanto, antes de cada dose, os animais eram pesados para correta administração da dose das drogas.

3.5 TRATAMENTOS

Os ratos do grupo experimento receberam tratamentos diários com tacrolimus e micofenolato-mofetil. Diariamente, eram pesados e, a partir do peso verificado, eram calculadas as doses dos medicamentos acima citados.

O tacrolimus (Prograf[®] - Janssen Cilag - Fujisawa) foi administrado, diariamente por via subcutânea na dose de 0,1mg/kg/dia pelo período de 15 dias, utilizando-se solução de tacrolimus 0,05mg/ml, preparada em solução fisiológica (NICOLUZZI et al., 2003).

A solução padrão de tacrolimus era obtida a partir de uma ampola contendo 5mg de tacrolimus diluída em volume final de 100ml com solução fisiológica. Para a inoculação, utilizaram-se seringas descartáveis de 1ml com subdivisões a cada 0,05ml (Beckton-Dickinson) nos animais sedados por inalação rápida com halotano (Tanohalo-Cristália[®]) em circuito fechado.

O micofenolato mofetil (Cellcept - Roche[®]) foi administrado diariamente na dose de 20mg/kg/dia, por quinze dias, por via oral utilizando sonda de gavagem durante a mesma sedação inalatória da aplicação do tacrolimus (NICOLUZZI et al., 2009).

A solução para a gavagem do micofenolato foi obtida por maceração de um comprimido, contendo 500mg de micofenolato mofetil ressuspendido, em 10ml de solução fisiológica, homogeneizado em agitador magnético por 5 minutos. A seguir, preparavam-se diluições 10^{-1} dessa solução, sendo utilizada a solução diluída a 10^{-1} para a administração proporcional ao peso de cada rato, por via oral. A solução padrão continha 5mg/ml de micofenolato mofetil.

Os animais do grupo simulação foram submetidos às mesmas condições de sedação e receberam, diariamente, injeções subcutâneas e gavagem de solução salina isotônica no volume proporcional ao peso.

3.6 COLETA DE AMOSTRAS

Ao décimo quinto dia de evolução, todos os ratos foram sedados por inalação rápida com halotano (Tanohalo-Cristália[®]), em circuito fechado, submetidos à punção cardíaca para coleta sangue em seringa de 20 ml, com agulha 25x8mm (Beckton-Dickinson[®]), em volume de, no mínimo, 10ml, suficiente para a indução de parada cárdio-respiratória. As amostras de sangue foram, imediatamente, enviadas ao laboratório de Análises Clínicas para dosagens bioquímicas.

Constatada a morte do animal, este era fixado em prancheta cirúrgica, onde era reaberta sua parede abdominal. Examinava-se a cavidade e ressecava-se a bexiga. A área de cistorrafia era isolada e seccionada do restante da parede vesical, fixada em formalina tamponada a 10% e identificadas. A seguir, todas as amostras foram enviadas ao laboratório de Anatomia Patológica para análise dos parâmetros de síntese de colágeno.

3.7 AVALIAÇÕES

3.7.1 Avaliações Bioquímicas

As amostras de sangue foram enviadas ao laboratório para dosagens séricas de tacrolimus (nanogramas/ml), uréia (mg/dl), creatinina (mg/dl), bilirrubina total (mg/dl) e transaminases (TGO e TGP - U/L).

Dosagem de Tacrolimus:

Empregou-se o ensaio IMx Tacrolimus II (ABBOT csc 0800-11-90-99), descrito por Winkler e colaboradores (1995), que se baseia na metodologia imunoenzimática de micropartículas (MEIA) (WINKLER et al., 1995). Os resultados foram expressados em ng/ml.

Dosagens de ureia, creatinina, bilirrubina total, transaminases glutâmico-pirúvica (TGP) e glutâmico-oxalacética (TGO):

Foi utilizado método automatizado através do equipamento Selectra II® (Bayer-Vitalab) com reativos específicos (HENRY et al., 1974).

3.7.2 Avaliações Histopatológicas

Avaliação histométrica da porcentagem de colágeno vesical maduro e imaturo:

Após a fixação das amostras em formalina, procederam-se secções perpendiculares ao maior eixo da sutura e submetidas ao processamento histológico através de desidratação, diafanização e emblocamento em parafina. A seguir, foram feitos cortes por microtomia a 4 µm de espessura e submetidos à “desparafinização”, hidratação e então corados por uma hora com solução a 0,1% de *Sirius Red* (*Sirius Red F 3B 200*®, Mobay Chemical Co., Union), dissolvido em ácido pícrico aquoso saturado. Os cortes foram lavados por cinco minutos em água corrente e contra-corados com Hematoxilina de Harris por dois minutos. As lâminas foram avaliadas sob microscopia de luz normal e luz polarizada, conforme descrito por Junqueira, Cossermelli e Brentani em 1978 (JUNQUEIRA; COSSERMELLI; BRENTANI, 1978).

Foram avaliadas a área, densidade e a porcentagem dos colágenos tipo I e III. Para identificação de colágeno maduro e imaturo, os cortes histológicos foram analisados por meio de microscópio óptico da marca Olympus®, em aumento de 400 vezes, utilizando-se fonte de luz polarizada. As imagens foram captadas por câmera Sony® CCDIRIS, transmitidas por monitor colorido Trinitron Sony®, congeladas e digitalizadas por meio de placas Oculus TCX (figura 5).

Realizou-se a análise das imagens mediante o aplicativo *Image Pro-Plus* versão 4.5 para *Windows* (RGB), em computador da linha Pentium III® 733MHz. Esse programa identifica o tipo de colágeno baseado em cores. Vermelho, amarelo e laranja correspondem a colágeno tipo I (maduro), enquanto que o verde é igual a colágeno tipo III (imaturo). Três campos foram avaliados (superior, médio e inferior) perpendicularmente à anastomose. O resultado foi expresso em área percentual.



FIGURA 5 - MICROSCÓPIO ÓPTICO OLYMPUS®, ACOPLADO A CÂMERA SONY® E COMPUTADOR PENTIUM - APLICATIVO IMAGE PRÓ-PLUS VERSÃO 4.5. UTILIZADO PARA LEITURA DO COLÁGENO MADURO E IMATURO.

3.7.3 Análise Estatística

Recorreu-se à análise descritiva dos dados por meio de gráficos e tabelas. Foram utilizados os testes paramétrico “t de *Student*” e “ANOVA” com o aplicativo “*GraphPad*”, e adotou-se o nível de significância (probabilidade de significância) menor que 5 % ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

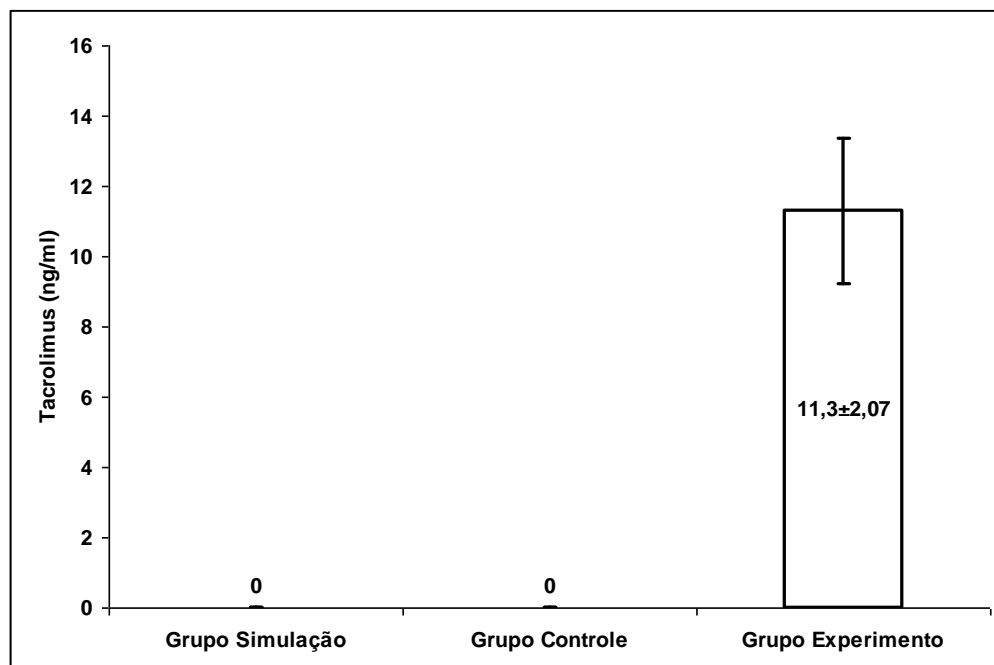
4.1 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS

As avaliações bioquímicas evidenciaram que no grupo experimento, ao décimo quinto dia de evolução, os ratos dispunham do imunossupressor tacrolimus circulante, e as dosagens de ureia, creatinina, bilirrubina total, e transaminases não sofreram alterações durante o tratamento com tacrolimus e micofenolato-mofetil.

4.1.2 Dosagens de Tacrolimus

Conforme representado no gráfico 1, observa-se que nos grupos simulação e controle, não foram detectados níveis séricos da droga. No grupo experimento, detectou-se média de $11,3 \pm 2,07$ ng/ml de tacrolimus, e os resultados individuais de cada rato estão disponíveis no apêndice 1.

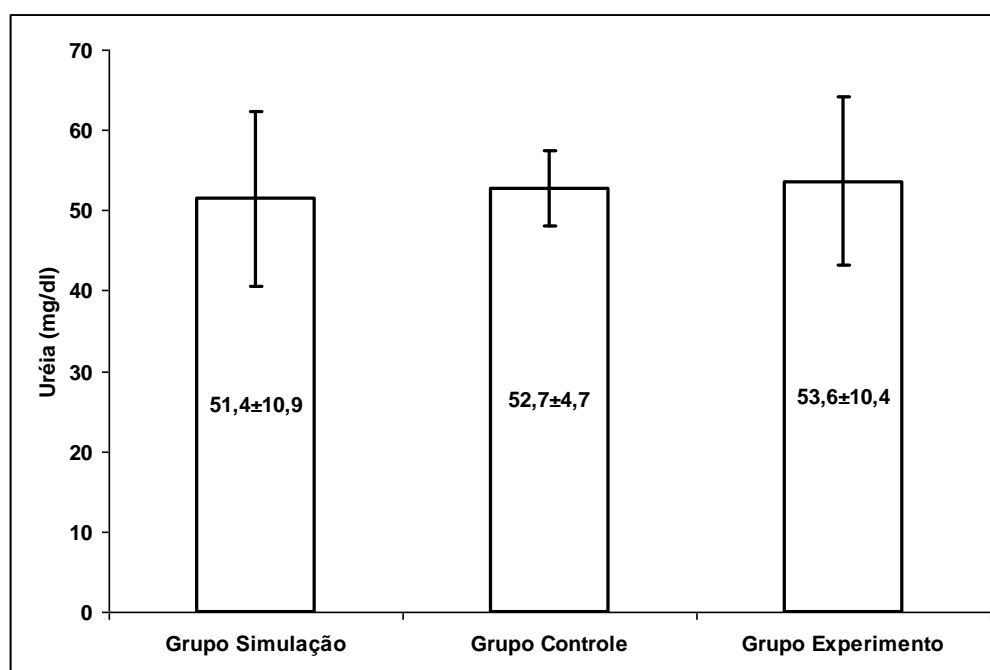
GRÁFICO 1 – DOSAGENS SÉRICAS DE TACROLIMUS (ng/ml)



4.1.2 Dosagens de Uréia

No gráfico 2, observa-se que, no grupo controle, detectou-se média de $52,7 \pm 4,7$ mg/dl e, no grupo simulação, $51,4 \pm 10,91$ mg/dl de ureia. No grupo experimento, a média foi de $53,6 \pm 10,4$ mg/ml de ureia. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,8643$ - ANOVA). Os resultados individuais de cada rato estão disponíveis no apêndice 2.

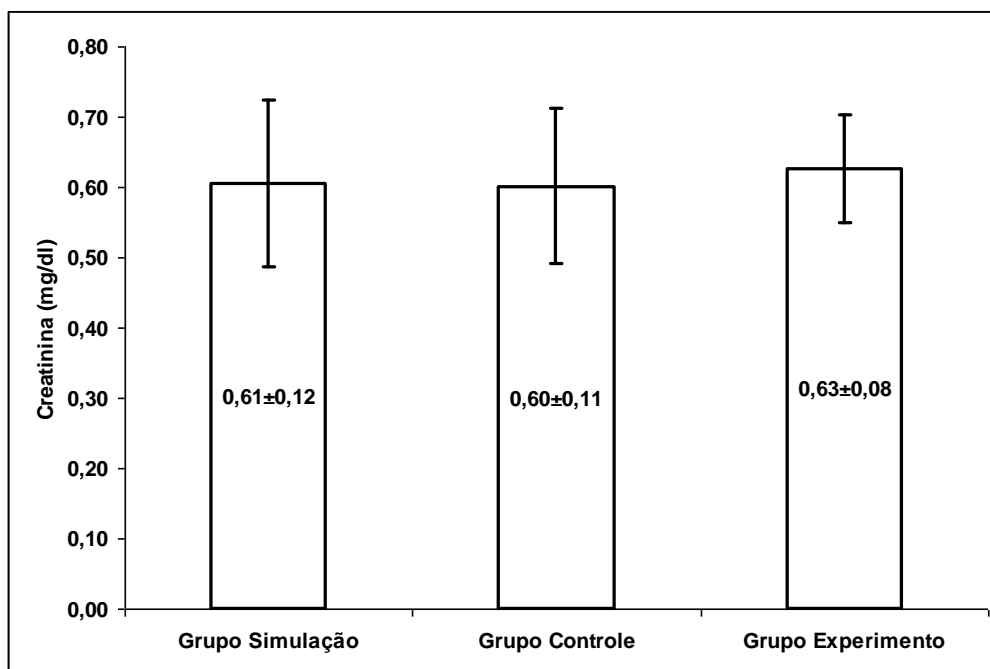
GRÁFICO 2 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DAS DOSAGENS DE UREIA (mg/dl)



4.1.3 Dosagens de Creatinina

O gráfico 3 demonstra que no grupo controle a média das dosagens de creatinina foi de $0,601 \pm 0,11$ mg/dl, e no grupo simulação, $0,605 \pm 0,117$ mg/dl. No grupo experimento, detectou-se média de $0,625 \pm 0,076$ mg/ml. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,8572$ - ANOVA) e os resultados individuais de cada rato estão disponíveis no apêndice 3.

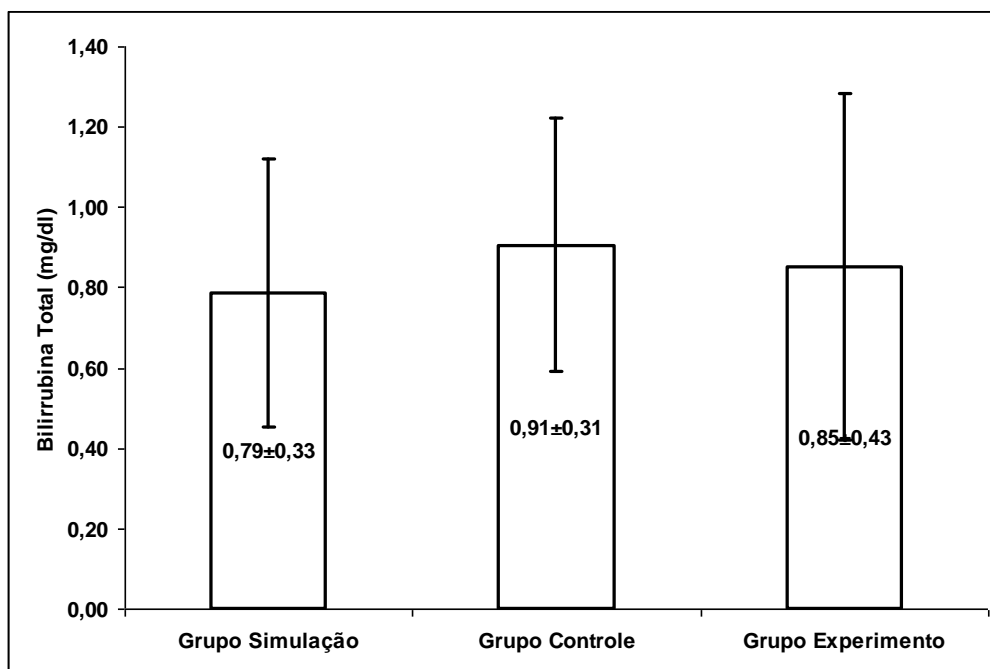
GRÁFICO 3 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DAS DOSAGENS DE CREATININA (mg/dl)



4.1.4 Dosagens de Bilirrubina Total

Conforme representado no gráfico 4, observa-se que no grupo controle a média de bilirrubina total foi de $0,905 \pm 0,314$ mg/dl; no grupo simulação, $0,786 \pm 0,334$ mg/dl, e no grupo experimento $0,851 \pm 0,431$ mg/ml. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,7664$ - ANOVA), e os resultados individuais de cada rato estão disponíveis no apêndice 4.

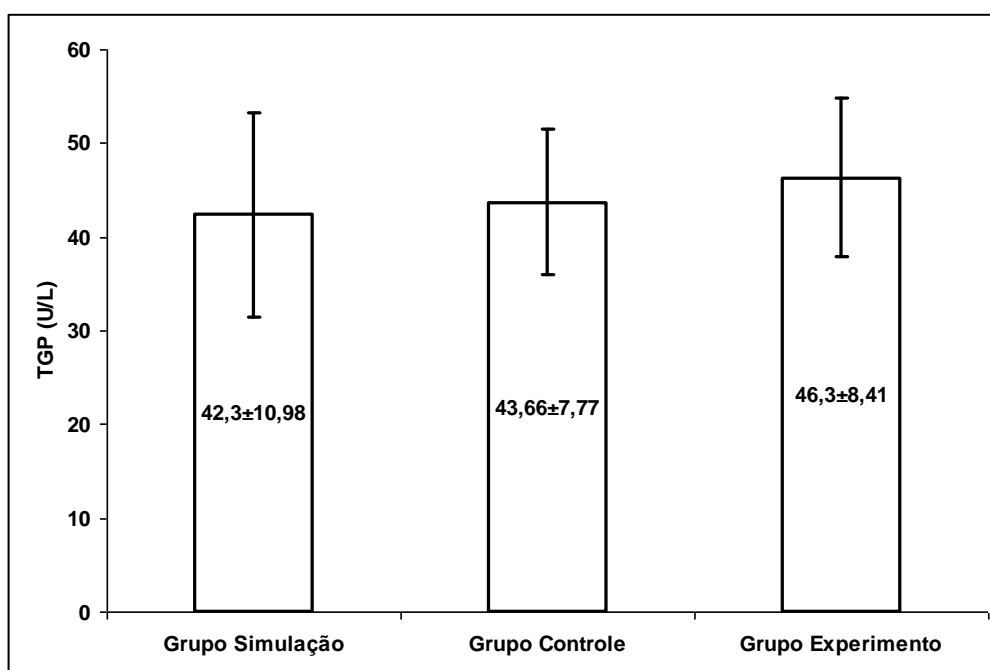
GRÁFICO 4 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DAS DOSAGENS DE BILIRRUBINA TOTAL (mg/dl)



4.1.5 Dosagens de Transaminase Glutâmico-Pirúvica (TGP)

O gráfico 5 demonstra que no grupo controle a média de TGP foi de $43,66 \pm 7,77$ mg/dl; no grupo simulação $42,3 \pm 10,98$ mg/dl e no grupo experimento, detectou-se média de $46,3 \pm 8,4$ mg/ml. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,6162$ - ANOVA) e os resultados individuais de cada rato estão disponíveis no apêndice 5.

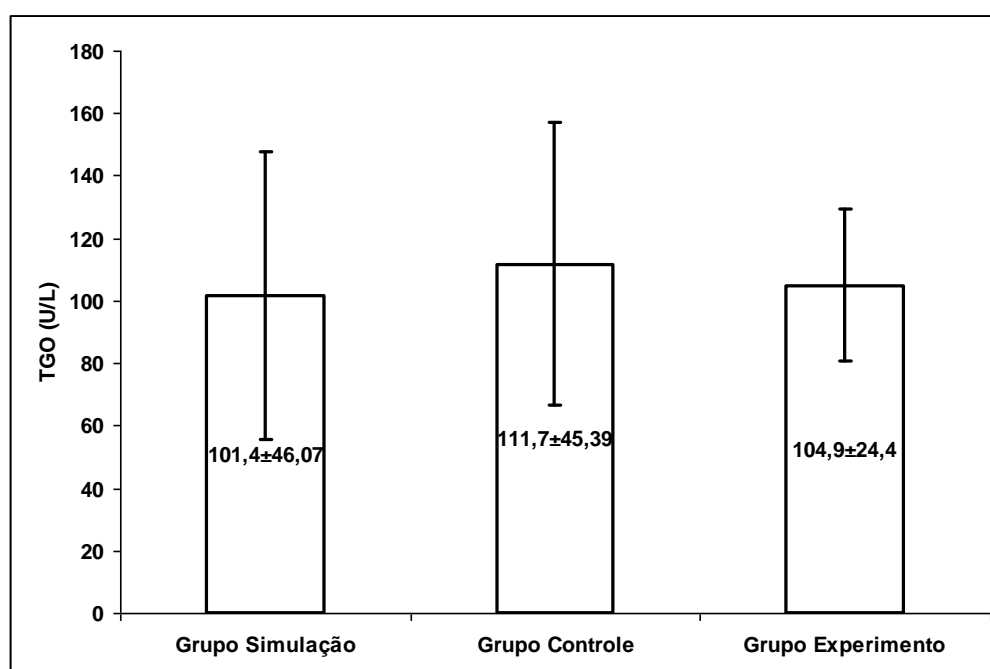
GRÁFICO 5 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DAS DOSAGENS DE TGP (U/L)



4.1.6 Dosagens de Transaminase Glutâmico-Oxalacética (TGO)

No gráfico 6, observa-se que no grupo controle a média de TGO foi de $111,7 \pm 45,32$ mg/dl; no grupo simulação, $101,4 \pm 46,07$ mg/dl, e no grupo experimento, $104,9 \pm 24,39$ mg/ml. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,8427$ - ANOVA), e os resultados individuais de cada rato estão disponíveis no apêndice 6.

GRÁFICO 6 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DAS DOSAGENS DE TGO (U/L)

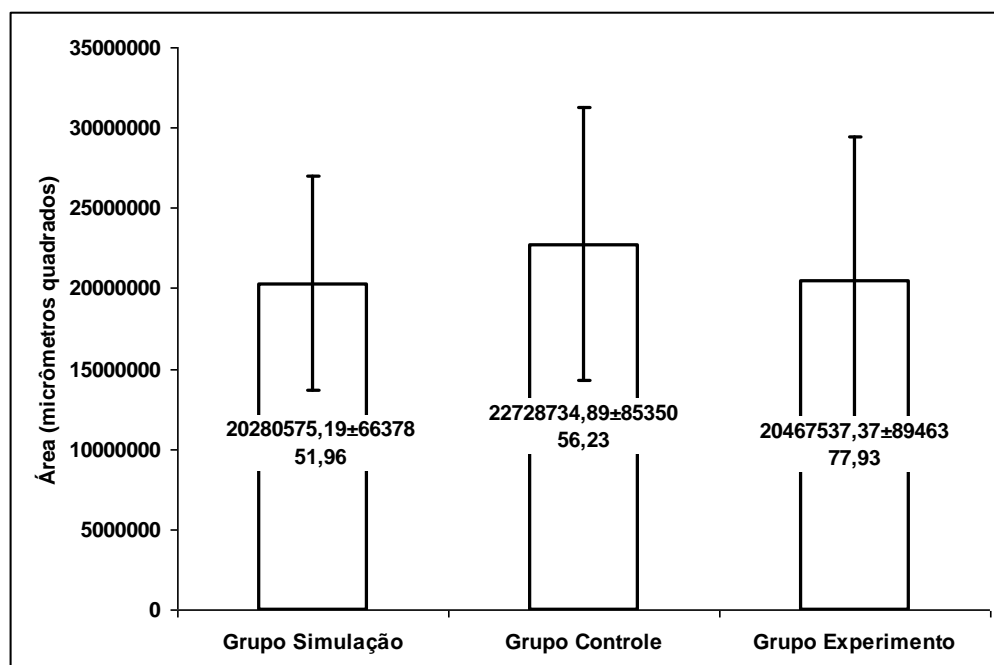


4.2 AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS

4.2.1 Avaliação histométrica das áreas de colágeno total

Nas comparações dos valores das áreas ocupadas por colágeno total entre os grupos, não foi observada diferença estatística (gráfico 7). O grupo controle apresentou média de $22.728.734,89 \pm 8.535.056,23 \mu\text{m}^2$; o grupo simulação, $20.280.575,18 \pm 6.637.851,96 \mu\text{m}^2$, e o grupo experimento $20.467.537,37 \pm 8.946.377,93 \mu\text{m}^2$ de colágeno total. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,7558$), e os resultados individuais de cada rato estão disponíveis no apêndice 7.

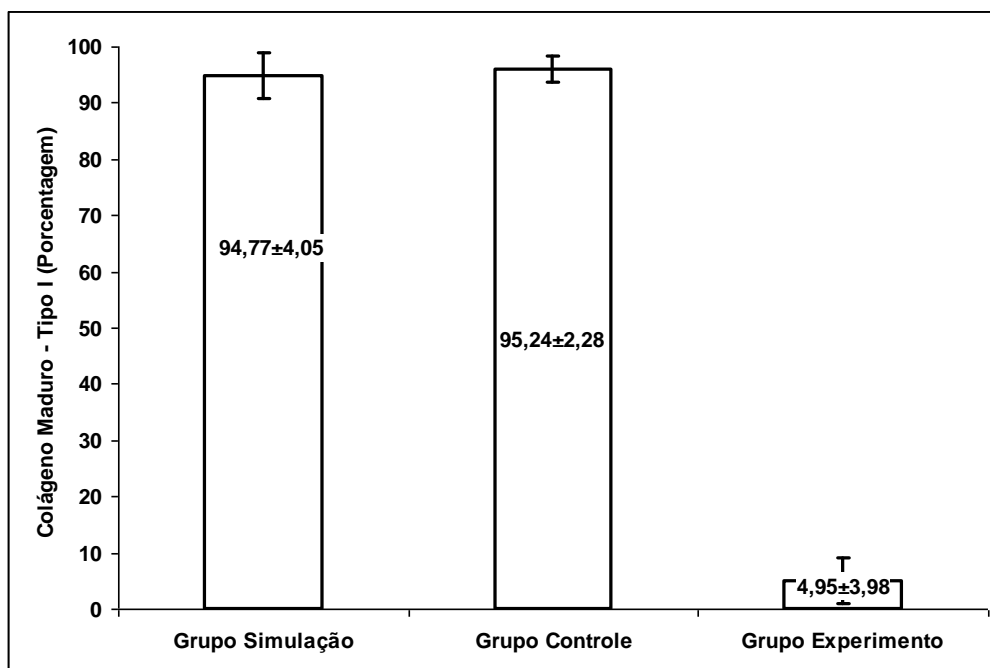
GRÁFICO 7 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DAS ÁREAS DE COLÁGENO TOTAL
(micrometros quadrados)



4.2.2 Avaliação histométrica das áreas de colágeno tipo I

Conforme representado na gráfico 8, observa-se que no grupo controle detectou-se média de $95,94 \pm 2,28\%$; no grupo simulação, $94,76 \pm 4,05\%$, e no grupo experimento, $4,95 \pm 3,97\%$ de colágeno maduro (tipo I). Entre os grupos controle e simulação não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,4362$). Na comparação entre os grupos simulação e experimento, houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,0001$) e na comparação entre os grupos controle e experimento, também houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,0001$). Os resultados individuais de cada rato estão disponíveis no apêndice 8.

GRÁFICO 8 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DAS DENSIDADES DE COLÁGENO MADURO (TIPO I) (area porcentual)



4.2.3 Avaliação histométrica das áreas de colágeno tipo III

Conforme representado no gráfico 9, observa-se que, no grupo controle, detectou-se média de $4,06 \pm 2,28\%$; no grupo simulação, $5,23 \pm 4,05\%$; no grupo experimento, $95,04 \pm 3,97\%$ de colágeno imaturo (tipo III). Entre os grupos controle e simulação, não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,3307$). Na comparação entre os grupos simulação e experimento, houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,0001$), e na comparação entre os grupos controle e experimento também houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,0001$). Os resultados individuais de cada rato estão disponíveis no apêndice 9. O gráfico 10 reúne as informações dos gráficos 8 e 9.

A figura 5 mostra os cortes histológicos corados pelo método *sirius red f3ba* (40x). À esquerda, evidenciando em vermelho, o colágeno tipo I e, em azul-verde, o colágeno tipo III e, à direita, sob luz polarizada, evidencia em vermelho o colágeno tipo I.

GRÁFICO 9 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DAS DENSIDADES DE COLÁGENO IMATURO (TIPO III) (area porcentual)

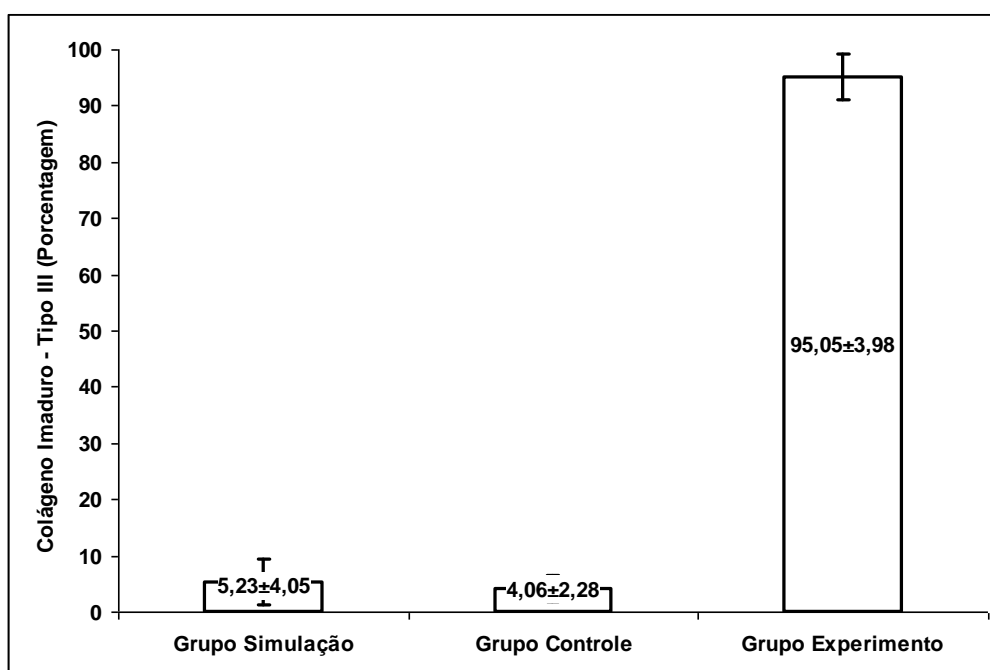


GRÁFICO 10 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DAS DENSIDADES DE COLÁGENO MADURO (TIPO I) E IMATURO (TIPO III) (area porcentual)

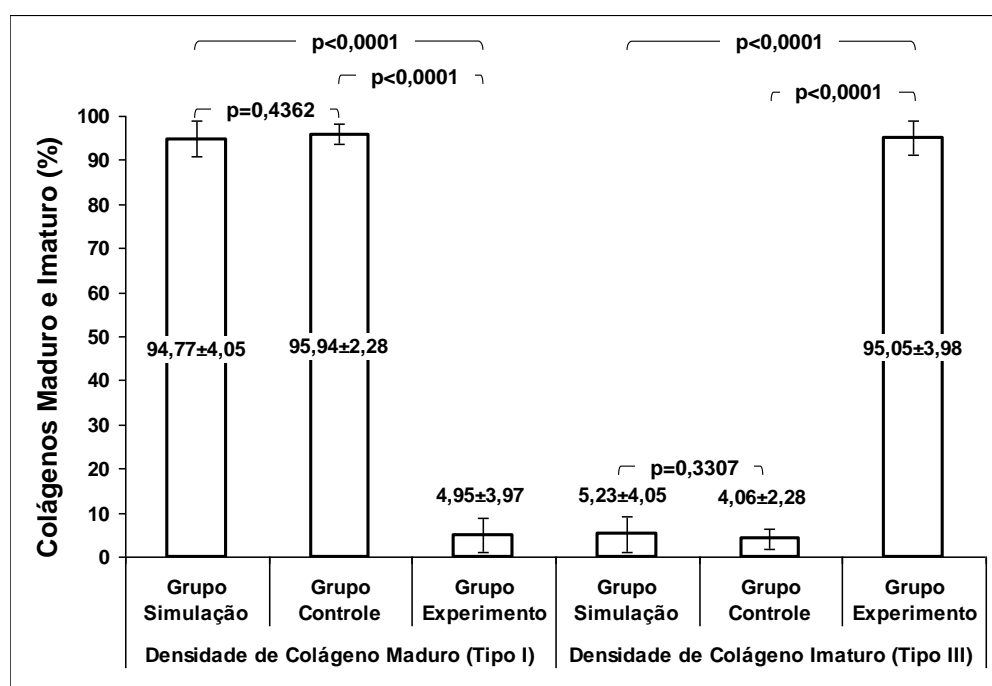
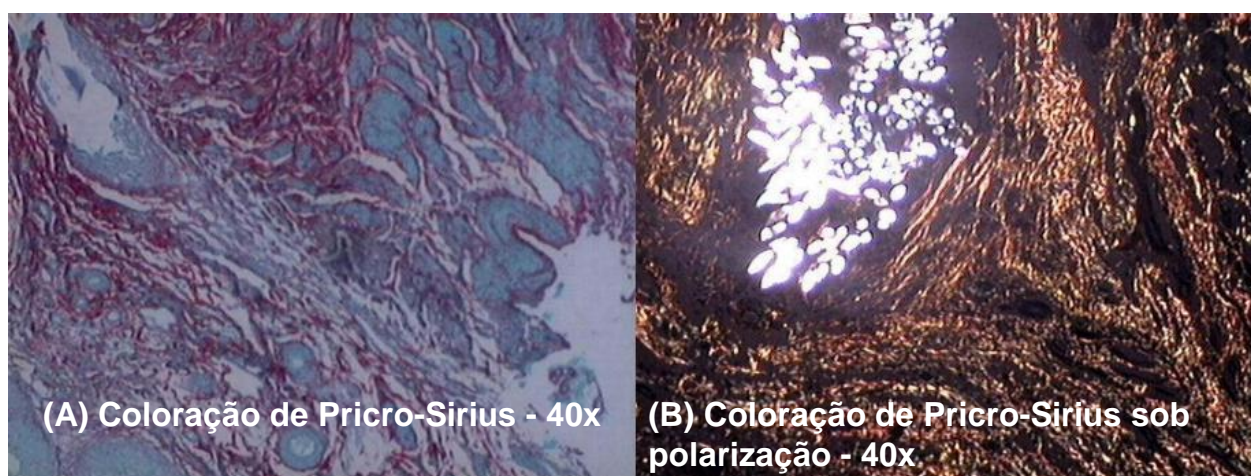


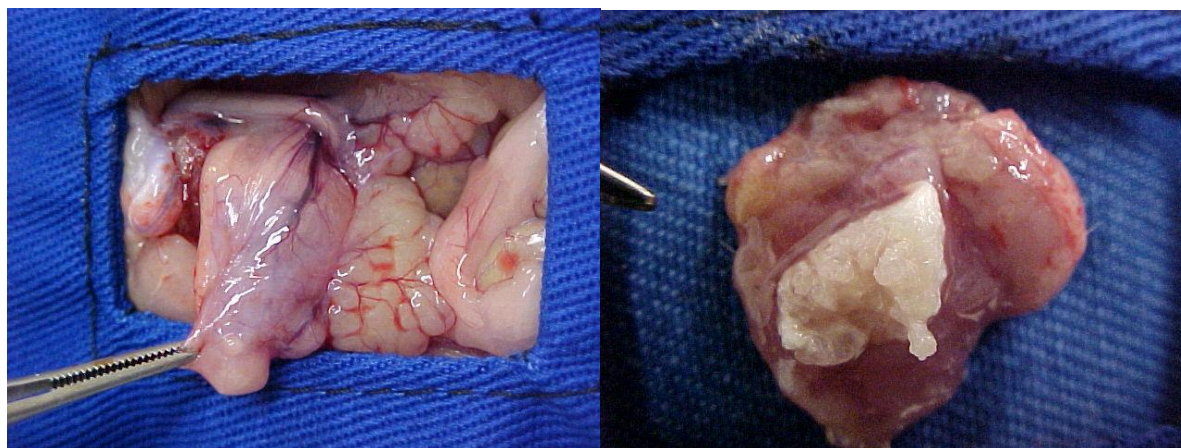
FIGURA 6 – CORTES HISTOLÓGICOS CORADOS PELO MÉTODO *SIRIUS RED F3BA* (40X). NO DETALHE (A), EVIDENCIA-SE EM VERMELHO O COLÁGENO TIPO I E, EM AZUL-VERDE, O COLÁGENO TIPO III. NO DETALHE (B), SOB LUZ POLARIZADA, EVIDENCIA-SE EM VERMELHO O COLÁGENO TIPO I.



Ainda nos resultados, nos ratos do grupo experimento observamos a formação de matriz calcúlosa intra-vesical em maior quantidade em relação aos grupos controle e simulação. O resultado não foi tratado de forma estatística por não

se tratar do objetivo do estudo. As imagens da formação da matriz calcúlosa são mostradas na figura 7.

FIGURA 7 – MAIOR FORMAÇÃO DE MATRIZ CALCULOSA NA BEXIGA DOS RATOS DO GRUPO EXPERIMENTO (A DIREITA) QUE NO GRUPO SIMULAÇÃO (A ESQUERDA).



5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A principal importância do presente estudo é a comprovação experimental da alteração qualitativa da síntese de colágeno da ferida operatória vesical de ratos submetidos a um esquema pré-definido de imunossupressão.

Diversos são os estudos mostrando as complicações e as alterações de cicatrização em vigência de imunossupressão, porém poucos são prospectivos e bem controlados. Muito estudou-se em outros tecidos como a pele e intestinos (THORNTON; BARBUL, 1997; FERREIRA, 2004; KORUDA; ROLANDELLI, 1990), mas pouco em urotélio. Nesse estudo, observa-se grande redução na produção de colágeno maduro, utilizando imunossupressão com tacrolimus e micofenolato-mofetil, após quinze dias de experimento. Tal fato, provavelmente relacionado à alteração da síntese de proteínas nas cadeias de colágeno.

O imunossupressor tacrolimus inibe a função imune celular, o aporte tissular de células inflamatórias e a síntese de fatores de modulação tissulares de células mesenquimais. Citocinas e fatores de crescimento sofrem redução de sua função com esse imunossupressor. Ocorre, também, redução do TGF- β e o aumento da expressão de fatores inibidores de reparo tissular como o INF γ e o TNF- α (SCHAFFER *et al.*, 2005). O micofenolato mofetil reduz a síntese de nucleotídeos, principalmente, por reduzir a síntese de purinas (AGUERA *et al.*, 1994), e impede a proliferação de linfócitos B (MELE; HALLORAN, 2000).

As cadeias de colágeno maduro em sua estrutura molecular apresentam fibras mais espessas e com maior entrelaçamento (com maior organização). A redução da síntese proteica causada pelas drogas imunossupressoras resulta ao final de quinze dias de cicatrização em bexigas, no surgimento de fibras de colágeno menos organizadas, com menor diâmetro e menor entrelaçamento (características do colágeno imaturo) mais frágil e com menor força tênsil ao tecido cicatrizado (RABAU *et al.*, 1998). Tal diferença, quando tratada de forma estatística, demonstra significância. No presente estudo, a escolha do tipo de imunossupressão baseou-se em vários estudos que comprovam as vantagens da associação do tacrolimus com o micofenolato mofetil.

Sampaio, em 2008, relatou o grande impacto na rejeição aguda, observada com a introdução dos inibidores da calcineurina, inicialmente com a ciclosporina e,

posteriormente, com o tacrolimus como imunossupressão de base. A terapia adjuvante demonstrou redução ainda maior dos índices de rejeição aguda com azatioprina e, mais recentemente, com o uso do micofenolato mofetil e o sirolimus.

Em estudo prospectivo comparando as associações de micofenolato-mofetil e tacrolimus com sirolimus e tacrolimus, esse mesmo autor teve resultados que, em segmento de um ano, confirmou função renal superior em pacientes que receberam tacrolimus, associado ao micofenolato-mofetil, e não houve alteração nos índices de rejeição. Os esquemas relacionados com o sirolimus são relacionados a um aumento do risco cardiovascular, pelo aumento médio da pressão arterial, do colesterol sérico e ainda da proteinúria (SAMPAIO *et al.*, 2008).

Protocolos de estudo internacionais (SWTC) não veem diferença estatística entre a imunossupressão com o tacrolimus e a ciclosporina quanto aos índices de rejeição aguda, porém existe uma tendência a maior sobrevida com o uso do tacrolimus (SOUTH WEST TRANSPLANT CENTRE, 2006). Plosker em 2000 comparou o tacrolimus com a ciclosporina C para imunossupressão em transplantes de fígado e rins tendo o tacrolimus melhores resultados (PLOSKER; FOSTER, 2000). Scott, em comparação similar, observou a boa tolerabilidade do tacrolimus com menores índices de hipertensão arterial, hiperlipidemia, gengivite e hiperplasia gengival que a ciclosporina. Também a função renal, avaliada pela creatinina sérica e taxa de filtração glomerular mostrou benefícios do tacrolimus com relação à ciclosporina em *follow up* de 5 anos (SCOTT *et al.*, 2003.).

O uso do MMF reduz significativamente a incidência de episódios de rejeição, quando comparada à azatioprina (AGUERA *et al.*, 1994). Três estudos randomizados, duplo-cego, demonstraram que MMF é mais eficaz do que a AZA ou de placebo, em combinação com ciclosporina, além de um esteroide, para a prevenção da rejeição do enxerto (MELE; HALLORAN, 2000). Em uma revisão de esquemas de imunossupressão, observou que, ao adicionar ao esquema imunossupressivo drogas como o micofenolato mofetil, houve um aumento na sobrevida média do enxerto, por redução de rejeição aguda e de nefropatia crônica (BARBARI; STEPHAN; MASRI. 2007).

Tacrolimus associado ao micofenolato mofetil é o esquema de imunossupressão padrão no serviço de transplante renal do Hospital Angelina Caron.

Quanto à monitorização sérica das drogas utilizadas, observa-se que o tacrolimus pode e deve ser monitorizado. Isso para se comprovar se a concentração sérica está adequadamente dentro da faixa terapêutica e fora da faixa tóxica (WINKLER *et al.*, 1994). Neste estudo, os animais do grupo controle e simulação não tiveram a droga detectada em suas amostras. Já os animais do grupo experimento, tiveram a referida droga detectada em suas amostras na faixa de 9 a 13ng/ml com média de 11,3ng/ml, faixa terapêutica da droga.

Na literatura, muitos outros autores relatam o efeito deletério da imunossupressão na cicatrização tecidual. Kita, em 1999, estudou os efeitos do tacrolimus na cicatrização de intestino delgado e cólon de ratos, observando que a força tensional (pressão de ruptura da anastomose) de anastomoses de cólon teve menor resistência em animais tratados com tacrolimus. Quando estudado o mesmo fator em intestino delgado, não se observou diferença entre os grupos tacrolimus e solução salina isotônica, ao final de sete dias de tratamento com o tacrolimus por via intra-peritonal (KITA *et al.*, 1999).

Em contrapartida, em 2002 Kiyama estudou os mesmos efeitos do tacrolimus em cicatrização aguda colônica em ratos e encontrou diferentes resultados. Os dados obtidos por esse autor mostram que o tacrolimus melhora a cicatrização de anastomoses do cólon, refletido pelo aumento da pressão de ruptura de tecido colônico de anastomose de ratos, após 4 dias de tratamento com tacrolimus. Também foi analisado a deposição de colágeno e não houve alteração entre o grupo controle e o grupo experimento (KIYAMA *et al.*, 2002). Este estudo contraria também o presente experimento quanto à deposição tissular de colágeno. Flachner estudou as complicações em feridas operatórias envolvendo diferentes esquemas de imunossupressão em 513 pacientes. Comparando os esquemas de micofenolato mofetil, sirolimus e prednisona com o esquema de ciclosporina, micofenolato com prednisona e azatioprina, ciclosporina e prednisona não se observou aumento das complicações. O único fator de risco para complicações cirúrgicas foi o índice de massa corporal, sendo que o IMC acima de 30 foi associado a maior número de complicações. Goldfarb, em 2002, encontrou resultados semelhantes (FLECHNER *et al.*, 2003).

Outros estudos comparando imunossupressão com cicatrização tecidual são citados a seguir: Michael Schaffer e Nico Fuchs estudaram os efeitos do tacrolimus

na cicatrização de derme e de tecido intestinal. Nos seus resultados, os autores observaram diferentes efeitos. Nesse estudo, a administração de 2mg/kg de tacrolimus levou à redução da cicatrização da derme dos animais, efeito acompanhado por redução da concentração tissular de TGF- β e aumento dos níveis de INF- γ e TNF- α . Já no estudo da cicatrização de feridas intestinais, não houve diferença nesses dados (SCHÄFFER *et al.*, 2005).

Estudando cicatrização em bexiga, Ekici observou que o imunossupressor sirolimus afeta todas as etapas da cicatrização vesical, incluindo a diminuição do número de células inflamatórias, angiogênese e a proliferação de miofibroblastos, adiando o processo de cicatrização (EKICI *et al.*, 2007).

Usando o mesmo imunossupressor do presente estudo, Gagliano estudou a expressão de fibroblastos gengivais, incubados por 72 horas em solução de tacrolimus. A produção de colágeno dos tipos I e III (aferida pela expressão dos genes produtores dos diferentes tipos de colágeno) pelos fibroblastos incubados em tacrolimus não se alterou ao final do experimento (GAGLIANO *et al.*, 2008).

O uso isolado do tacrolimus parece piorar a função renal, ao passo que o uso do micofenolato é apontado como efeito protetor para a função renal ao serem analisados a creatinina, uréia e a albuminúria (GARCIA *et al.*, 2004; ANDRES *et al.*, 2005; CHEUNG *et al.*, 2009; INACIO *et al.*, 2010; PONTON *et al.*, 2010; BOESEN *et al.*, 2010).

O presente estudo também realizou aferições bioquímicas de função renal e função hepática. Os parâmetros analisados foram a creatinina, ureia, bilirrubina total, transaminase glutâmico pirúvica (TGP) e transaminase glutâmico-oxalacética (TGO). Não se observou diferença estatística nas aferições de nenhum desses parâmetros analisados ao final de 15 dias de experimento com tacrolimus e micofenolato mofetil. Contrariando os presentes achados, Garcia, estudando ciclosporina e tacrolimus, observou alteração da hemodinâmica glomerular com redução da filtração glomerular e alterações histológicas caracterizadas pela presença de vacuolização tubular e fibrose intersticial. Observou, também, que o uso contínuo e em altas doses dessas drogas tem como limitação principal a nefrotoxicidade. Comparando-se as duas drogas em um período de duas semanas, concluiu-se que a ciclosporina afeta a hemodinâmica e a pressão arterial, predispondo o transplantado a maiores índices de falência renal que o tacrolimus (GARCIA *et al.*, 2004). Estudos

precedentes indicam que, apesar do tacrolimus ter ação nefrotóxica, pacientes em uso de ciclosporina têm redução da nefrotoxicidade quando a ciclosporina é substituída pelo tacrolimus.

Em estudo recente, Inacio avaliou as alterações na evolução do carcinosarcoma 256 de Walker, inoculado no rim de ratos Wistar, sob tratamento imunossupressor com o tacrolimus, em ratos Wistar. Amostras de sangue coletadas para dosagem de creatinina e ureia foram maiores nos grupos tacrolimus, com relação àquelas dos grupos de ratos que não receberam tacrolimus (INACIO *et al.*, 2010).

Talvez, a justificativa na inalteração da função renal, observada no presente estudo, seja explicada pelo estudo de Ponton cujo objetivo foi avaliar a viabilidade, eficácia e segurança do MMF, quando introduzido no esquema de imunossupressão (PONTON *et al.*, 2010). Tal inclusão propicia redução da dosagem dos CNI na manutenção do protocolo de imunossupressão, melhorando a função renal em receptores de transplante hepático, com disfunção renal crônica. A aplicação de um protocolo de imunossupressão com MMF e de baixo nível CNI em receptores de transplante hepático com disfunção renal crônica foi associada com melhora ou normalização da creatinina, sem um aumento do risco de rejeição. A conversão precoce é necessária para alcançar os melhores resultados. Barrere-pulido e colaboradores, em 2010, observaram efeito similar nos receptores de transplantes hepáticos com disfunção renal. Nos pacientes que não recebiam micofenolato no esquema de base e tinham alteração da função renal, a introdução do micofenolato mofetil foi acompanhada de melhora da função renal (BARRERA-PULIDO *et al.*, 2010).

Analisando-se a hepatotoxicidade dos imunossupressores em vigência de imunossupressão, a literatura nos mostra que os inibidores da calcineurina têm efeito hepatotóxico, demonstrado pela elevação das bilirrubinas, TGO e TGP (TANIAI *et al.*, 2008). O uso isolado do micofenolato também possui discreta hepatotoxicidade (BALAL *et al.*, 2005). No presente estudo, a associação dos dois imunossupressores não demonstrou elevação das enzimas hepáticas ao final de quinze dias de experimentação.

Balal, estudando a hepatotoxicidade do micofenolato mofetil (MMF) usado no transplante renal, citou seus efeitos colaterais gastrointestinal e hematológicos,

frequentemente observados. Com hepatotoxicidade raramente sendo relatada. No seu estudo, avaliou-se a hepatotoxicidade do MMF relacionadas em pacientes transplantados renais. No total de 79 pacientes, 11 pacientes (13,9%) tiveram aumento progressivo das enzimas hepáticas. O tempo médio de aumento das enzimas hepáticas foi de 28 dias e, após redução de 50% ou a retirada do MMF, observou-se o retorno aos valores normais de função hepática em 16 dias. Após o transplante renal, a hepatotoxicidade pode ocorrer devido a uma série de razões, incluindo o uso de MMF. A hepatotoxicidade relacionada ao MMF deve sempre ser considerada, especialmente no período inicial do transplante renal (BALAL *et al.*, 2005).

Taniai relatou a ocorrência eventual de hepatotoxicidade por tacrolimus e por ciclosporina. Tal efeito é observado por elevação das enzimas hepáticas de forma isolada ou, então, acompanhadas de elevação de bilirrubinas. Quando tal efeito é observado, em geral, existe melhora com a redução da dose do imunossupressor. Quando apenas a redução da dosagem do imunossupressor (em até 25% da dose) não é suficiente, preconiza-se a mudança do imunossupressor, alternando-se a ciclosporina e o tacrolimus. Nos casos em que apenas essa alternância não surte efeito, pode-se reduzir a dosagem do inibidor da calcineurina, associando a introdução de micofenolato mofetil na imunossupressão (TANIAI *et al.*, 2008).

Como perspectiva a este experimento, que comprovou experimentalmente ser a imunossupressão com tacrolimus e micofenolato mofetil fator que altera significativamente a produção qualitativa de colágeno, existe a necessidade de novos estudos que comparem as diferentes drogas isoladamente com objetivo de avaliar quais são mais prejudiciais ou mais indolentes quanto a produção de colágeno e seus subtipos.

No presente estudo observou-se também maior formação de calculose vesical no animais tratados com o esquema imunossupressor. Sobre o assunto pouco se encontra na literatura a respeito. Nenhum dos estudos anteriormente citados mencionou tal relação. Em 1999, Rhee e colaboradores revendo uma série de 1730 transplantes renais e 83 transplantes pâncreas/rim na era da ciclosporina observaram taxas nefrolitíase de 0,23 e 1,2% e cálculos vesicais de 0% e de 4,8% respectivamente, contrastando com nossos achados (RHEE; BRETAN; STOLLER.

1999) Estudos futuros com análise direcionada ao fato podem ser de grande interesse e utilidade.

06 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que:

- 1) A associação dos imunossupressores tacrolimus e micofenolato mofetil altera qualitativamente a síntese de colágeno, acarretando maior produção proporcional de colágeno do tipo III, após quinze dias de tratamento nas doses utilizadas.
- 2) A associação dos imunossupressores tacrolimus e micofenolato mofetil não altera a função renal e a função hepática, mensuradas pelos parâmetros de ureia, creatinina, bilirrubinas e transaminases, após quinze dias de tratamento nas doses utilizadas.

REFERÊNCIAS

- ABBUD FILHO, M.; RAMALHO, H.J. Revisão/atualização em transplante renal: novos agentes imunossupressores. **J. Bras. Nefrol.**, São Paulo, v.19, n.2, p.215-223, 1997.
- AGUERA, L. *et al.* Prognostic implications of urological complications in the renal transplantation. **Rev. Med. Univ. Navarra.**, Pamplona, v.38, n.4, p.195-200, 1994.
- ANDRES, A. *et al.* T. Impairment of renal function after islet transplant alone or islet-after-kidney transplantation using a sirolimus/tacrolimus-based immunosuppressive regimen, **Transplant. Int.**, Heidelberg, v.18, n.11, p.1226-1230, 2005.
- BACELAR JR, J.C. *et al.* Avaliação de hidrato de cloral, tiopental sódico e associação cetamina/xilazina na anestesia em ratos. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.14 p.149, 1999
- BARBARI, A.G.; STEPHAN, A.G.; MASRI, M.A. Calcineurin Inhibitor-Free Protocols: risks and benefits, **Saudi J. Kidney Dis. Transplant.**, Riyadh, v.18, n.1, p.1-23, 2007.
- BALAL, M. *et al.* Uncommon side effect of MMF in renal transplant recipients, **Renal Fail.**, New York, v.27, n.5, p.591-594, 2005.
- BARRERA-PULIDO, L. *et al.* Influence of mycophenolate mofetil on preservation of kidney function in liver transplant patients. **Transpl. Proc.**, New York, v.42, n.2, p. 651-655, 2010.
- BOESEN, E.I. *et al.* Immunosuppression with mycophenolate mofetil attenuates the development of hypertension and albuminuria in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, Oxford, v.37, p.1016-1022, 2010.
- BRASKEN, P. Healing of experimental colonic anastomosis. **Eur. J. Surg. Suppl.**, Stockholm, suppl. 66, p.1-51, 1991.
- CHEUNG, C.Y. *et al.* Long-term graft function with tacrolimus and cyclosporine in renal transplantation: paired kidney analysis. **Nephrology**, Carlton, v.14, n.8 p.758-763, 2009.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - COBEA. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP-EPM / AFIP / FAPESP, 2000. Disponível em: <http://www;cobea;org/principios;htm>; Acesso em: 12/02/2010.
- DAYAN, D. *et al.* Are the polarization colors of picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? **Histochemistry**, Berlin, v.93, n.1, p. 27-29, 1989.

EDLICH, R.F. The biology of wound repair and infection: a personal odyssey. **Ann. Emerg. Med.**, Lansing, v.14, n.10, p.1018-1025. 1985.

EKICI, Y. *et al.* Effect of rapamycin on wound healing: an experimental study, **Transpl. Proc.**, New York, v.39, n.4, p.1201-1203, 2007.

FERREIRA, M. **Radioterapia pré e pós-operatória na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos avaliada mediante estudo tensiométrico, histológico e da morfometria do colágeno.** Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

FLECHNER, S. M. *et al.* The impact of sirolimus, mycophenolate mofetil, cyclosporine, azathioprine, and steroids on wound healing in 513 kidney-transplant recipients, **Transplantation**, Baltimore, v.76, n.12, p.1729-1734, 2003.

GAGLIANO, N. *et al.* therapeutic dose of FK506 does not affect collagen turnover pathways in healthy human gingival fibroblasts. **Transpl. Proc.**, New York, v.40, n.5, p. 1419-1424, 2008.

GARCIA, S.C. *et al.* Ciclosporina A e tacrolimus: uma revisão. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v.40, n.6, p. 393-401, 2004.

GOLDFARB, D.A. Are wound complications after a kidney transplant more common with modern immunosuppression? **Transplantation**, Baltimore, v.72, n.12, p.1726-1729, 2002.

HENDRICKS, T.; MASTBOOM, W. J. B. Healing of experimental intestinal anastomosis: aprameters for repair. **Dis. Colon Rectum**, Philadelphia, v.33, p.891-901, 1990.

HENRY, R.J.; CANNON, D.C.; WINKELMAN, J.W. **Clinical chemistry: principles and techniques.** New York: Harper & Row, 1974. p.362–364.

HÖGSTRÖM, H. *et al.* Influence of intraperitoneal *escherichia coli* with septicemia on the healing of colonic anastomoses and skin wounds. **Eur. Surg. Res.**, Basel, v. 17, p. 128-132, 1985.

HUMAR, A. *et al.* Are wounds complications after kidney transplant more common with modern immunosuppression? **Transplantation**, Baltimore, v.72, n.12, p.1920-1923, 2001.

INÁCIO, C.M. *et al.* Action of tacrolimus on Wistar rat kidneys implanted with Walker 256 carcinosarcoma. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.25, n.1, p.98-104, 2010.

JIBORN; H., AHONEN; J., ZEDERFELDT; B. Healing of experimental colonic anastomoses III: collagen metabolism in the colon after left colon resection. **Am. J. Surg**, New York, v. 139, p. 398-405, 1980.

JUNQUEIRA, L.C.U.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. **Arch. Histol. Jpn.**, Okayama, v.41, n.3, p. 67-274, 1978.

JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R. picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections, **Histochem. J.**, London, v.11, n.4, p.447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L.C.U.; MONTES, G.S.; SANCHEZ, E.M. The influence of tissue thickness on the study of collagen by the picrosirius-polarization method. **Histochemistry**, Berlin, v.74, supl.1, p.153-156, 1982.

KASISKE, B.L. Epidemiology of cardiovascular disease after renal transplantation. **Transplantation**, Baltimore, v.72, p.S5-S8, 2001.

KITA, J. *et al.* Effects of tacrolimus on small and large bowel anastomoses in the rat. **Transpl. Proc.**, New York, v.31, n.7, p. 2789, 1999.

KIYAMA, T. *et al.* Tacrolimus enhances colon anastomotic healing in rats. **Wound Repair Regen.**, St. Louis, v.10, n.5, p. 308-313, 2002.

KORUDA, M. J.; ROLANDELLI, R. H. Experimental studies on the healing of colonic anastomoses. **J. Surg. Res.**, New York, v. 48, n. 5, p. 504-515, 1990.

LAI, W. *et al.* Mycophenolate mofetil-based calcineurin inhibitor reduced immunosuppressive protocol for the improvement of renal dysfunction after liver transplantation. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, Taipei, v.89, n.22, p.1529-1532, 2009.

MAEKISALO, H. *et al.* Urological complications after 2084 consecutive kidney transplantations. **Transpl. Proc.**, New York, v.29, n.1/2, p.152-153, 1997.

MEIER-KRIESCHE, H.U. *et al.* Infectious complications in geriatric renal transplant patients: comparison of two immunosuppressive protocols. **Transplantation**, Baltimore, v.68. n.10, p.1496-1502, 1999.

MELE, T.S.; HALLORAN, P.F. The use of mycophenolate mofetil in transplant recipients. **Immunopharmacology**, Amsterdam, v.47, n.2/3, p, 215-245, 2000.

NICOLUZZI, J.E.L. *et al.* Results of pancreatic transplantation in a brazilian center. **Rev. Col. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v.30, n.6, p. 436-441. 2003.

NICOLUZZI, J.E.L. *et al.* One hundred pancreas transplants performed in a brazilian institution. **Transplant. Proc.**, New York, v.41, n.10, p.4270-4273, 2009.

NORONHA, I.L. *et al.* Micofenolato mofetil (MMF) em transplante de órgãos, **J. Bras. Nefrol**, São Paulo, v.19, n.4, p. 398-406, 1997.

PLOSKER, G.L.; FOSTER, R.H. Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. **Drugs**, New York, v.59, n. 2, p.323-389, 2000.

PONTON, C. *et al.* E. Improvement of renal function after conversion to mycophenolate mofetil combined with low-level calcineurin inhibitor in liver transplant recipients with chronic renal dysfunction. **Transpl. Proc.**, New York, v.42, n.2, p. 656-659, 2010.

RABAU, M. *et al.* Bursting pressure in anastomotic healing in experimentally induced colitis in rats. **Dis. Colon Rectum**, Philadelphia, v. 41, n. 4, p. 468-472, 1998.

RHEE, B.K.; BRETAN, P.N.; STOLLER, M.L. Urolithiasis in renal and combined pancreas/renal transplant recipients. **J Urol**, San Francisco, v.161, n.5, p. 1458-1462, 1999.

SAMPAIO, EL. *et al.* Mycopenolate mofetil vs. sirolimus in kidney transplant recipients receiving tacrolimus-based immunosuppressive regimen. **Clin. Transpl.**, Copenhagen, v. 22, p. 141-149, 2008.

SCHAFFER, M.R. *et al.* Tacrolimus impairs wound healing, **Transplantation**, Baltimore, v.65, n.6, p. 813-818, 1998.

SCHMITZ, L.D. **Nutrição perioperatória suplementada com glutamina na cicatrização de anastomose colônica de ratos desnutridos**. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SCHÄFFER, M. *et al.* Differential effect of tacrolimus on dermal and intestinal wound healing. **J. Invest.Surg.**, New York, v.18, n.2, p.71-79, 2005.

SCOTT, L.J. *et al.* Tacrolimus: a further update of its use in the management of organ transplantation. **Drugs**, New York, v. 63, n.12, p.1247-1297, 2003.

SOUTH WEST TRANSPLANT CENTRE. Immunosuppression protocols July 2006. Disponível em <http://www.swtransplant.com/pdf/Immunosuppression%20protocols.pdf> < Acesso em 09/10/2010.

SWEAT, F.; PUCHTLER, H.; ROSENTHAL, S. I. Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. **Arch. Pathol.**, Chicago, v. 78, p. 69-72, 1964.

TAMBARA FILHO, R. *et al.* Complicações cirúrgicas de 366 transplantes renais. **Rev. Med. Paraná**, Curitiba v.55, n.1/2, p.9-17, 1998.

TANIAI, N. *et al.* Hepatotoxicity caused by both tacrolimus and cyclosporine after living donor liver transplantation, **J. Nippon Med. School**, Tokyo, v.75, n.3, p.187-191, 2008.

THORNTON, F.J.; BARBUL, A. Healing in the gastrointestinal tract. **Surg. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 77, n. 3, p. 549-573, 1997.

UENO, T. *et al.* Pathological change of articular cartilage in the mandibular head treated with immunosuppressant FK 506. **Histol. Histopathol.**, Murcia, v.19, n.1, p. 15-21, 2004.

WALKER, W.F.; HOMBERGER, D.G. **Anatomy and dissection of rat**. 3. ed. New York; W.H. Freeman, 1997. p. 15-17.

WHITE, M.B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surg. Clin. North Am.**, Philadelphia, V.77, N.3, P. 509-528, 1997.

WINKLER, M. *et al.* Plasma vs whole blood for therapeutic drug monitoring of patients receiving FK 506 for immunosuppression. **Clin. Chem.**, NewYork, v.40, n.12, p.2247-2253, 1994.

WINKLER, M. *et al.* Comparison of plasma vs whole blood as matrix for FK 506 drug level monitoring. **Transplant. Proc.**, New York, v.27, n.1, p.822-825, 1995.

DOCUMENTOS CONSULTADOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Normas para apresentação de documentos científicos**. 2. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007.

PUBMED: a service of the National Library of Medicine and the National Institutes of Health. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Último acesso em: 16/11/2010.

DeCS-BVS: Descritores em Ciências da Saúde – Biblioteca Virtual em Saúde. Disponível em: <<http://decs.bvs.br/>>. Último acesso em: 20/11/2010.

Dicionário Priberam da Língua Portuguesa. Disponível em <<http://www.priberam.pt/DLPO/>>. Último acesso em: 30/11/2010.

APÊNDICES

APÊNDICE 01

RESULTADOS DAS DOSAGENS DE TACROLIMUS (NANOGRAMAS/ML)

Ratos	Grupo Controle	Grupo Experimento
1	0	9,27
2	0	11,36
3	0	14,58
4	0	9,28
5	0	10,24
6	0	11,25
7	0	10,39
8	0	13,27
9	0	14,25
10	0	9,08
Média	0	11,3
Desvio Padrão	0	2,07

APÊNDICE 02

RESULTADOS DAS DOSAGENS DE UREIA E ESTATÍSTICA DESCRITIVA
(mg/dl)

Ratos	Grupo Simulação	Grupo Controle	Grupo Experimento
1	48	56	48
2	36	60	63
3	66	50	55
4	58	49	41
5	42	49	52
6	51	44	48
7	66	56	36
8	47	55	66
9	39	52	65
10	61	56	62
Média	51,4	52,7	53,6
Desvio Padrão	10,916	4,739	10,426
<i>p</i> (ANOVA)	0,8643		

APÊNDICE 03

RESULTADOS DAS DOSAGENS DE CREATININA E ESTATÍSTICA DESCRITIVA
(mg/dl)

Ratos	Grupo Simulação	Grupo Controle	Grupo Experimento
1	0,63	0,62	0,58
2	0,75	0,58	0,75
3	0,64	0,67	0,52
4	0,65	0,64	0,61
5	0,66	0,61	0,53
6	0,48	0,35	0,65
7	0,36	0,75	0,64
8	0,55	0,64	0,57
9	0,59	0,49	0,69
10	0,74	0,66	0,71
Média	0,6050	0,6010	0,6250
Desvio Padrão	0,1179	0,1104	0,07692
<i>p</i> (ANOVA)	0,8572		

APÊNDICE 04

**RESULTADOS DAS DOSAGENS DE BILIRRUBINA TOTAL E ESTATÍSTICA
DESCRITIVA (mg/dl)**

Ratos	Grupo Simulação	Grupo Controle	Grupo Experimento
1	1,22	0,61	0,85
2	1,14	0,52	0,54
3	0,45	0,93	0,78
4	0,78	0,66	1,46
5	0,45	1,35	0,83
6	0,25	0,64	0,95
7	0,64	1,38	1,67
8	0,98	0,93	0,54
9	0,82	0,82	0,23
10	1,13	1,21	0,66
Média	0,7860	0,9050	0,8510
Desvio Padrão	0,3342	0,3146	0,4311
<i>p</i> (ANOVA)	0,7664		

APÊNDICE 05

RESULTADOS DAS DOSAGENS DE TRANSAMINASES GLUTÂMICO-PIRÚVICA
(TGP) E ESTATÍSTICA DESCRITIVA (U/L)

Ratos	Grupo Simulação	Grupo Controle	Grupo Experimento
1	42,8	44,3	46,2
2	43,7	45,9	55,1
3	39,2	51,2	50,6
4	41,9	47,9	46,3
5	51,7	36,8	47,8
6	57,9	45,3	54,2
7	22,9	29,8	29,1
8	55,9	48,9	47,2
9	37,1	53,1	52,2
10	29,9	33,4	34,3
Média	42,300	43,660	46,300
Desvio Padrão	10,984	7,774	8,407
<i>p</i> (ANOVA)	0,6162		

APÊNDICE 06

**RESULTADOS DAS DOSAGENS DE TRANSAMINASES GLUTÂMICO-
OXALACÉTICA (TGO) E ESTATÍSTICA DESCRITIVA (U/L)**

Ratos	Grupo Simulação	Grupo Controle	Grupo Experimento
1	65	121	95
2	87	85	82
3	136	96	135
4	201	54	94
5	63	61	122
6	87	176	131
7	87	91	94
8	58	174	84
9	81	165	73
10	149	94	139
Média	101,40	111,70	104,90
Desvio Padrão	46,073	45,392	24,397
<i>p</i> (ANOVA)	0,8427		

APÊNDICE 07

**AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA DA ÁREA DE COLÁGENO TOTAL E ESTATÍSTICA
DESCRITIVA (área em micrômetros quadrados)**

Ratos	Grupo Simulação	Grupo Controle	Grupo Experimento
1	18709372,33	28639254,05	10452364,84
2	15753874,86	35552445,24	11584632,51
3	16522552,42	12416711,91	25447125,35
4	25631341,24	22322177,43	34195135,32
5	14165615,35	36334398,16	15927538,86
6	32246426,61	19668669,65	16582552,42
7	13318232,93	17816935,64	20321341,24
8	26624161,76	11414822,11	14161615,35
9	25452550,15	21111553,41	36334398,16
10	14381624,24	22010381,37	19668669,65
Média	20280575,2	22728734,9	20467537,4
Desvio Padrão	6637852,0	8535056,2	8946377,9
<i>p</i> (ANOVA)	0,7558		

APÊNDICE 08

**AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA PORCENTUAIS DE DENSIDADES DE COLÁGENO
MADURO (área porcentual)**

Ratos	Grupo Simulação	Grupo Controle	Grupo Experimento
1	86,2325	96,2574	10,5423
2	95,5478	98,2365	11,2561
3	97,4589	97,4556	5,3278
4	98,2365	97,2567	3,2412
5	93,251	95,6123	9,1746
6	99,3214	93,5674	1,5423
7	92,2547	95,1284	0,9863
8	95,8741	91,0236	2,3251
9	91,2587	98,5412	4,1634
10	98,2563	96,3245	0,9851
Média	94,769	95,940	4,954
Desvio Padrão	4,052	2,282	3,979
<i>p</i> (ANOVA)	< 0,0001		

APÊNDICE 09

**AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA PORCENTUAIS DE DENSIDADES DE COLÁGENO
IMATURO (área porcentual)**

Ratos	Grupo Simulação	Grupo Controle	Grupo Experimento
1	13,7675	3,7426	89,4577
2	4,4522	1,7635	88,7439
3	2,5411	2,5444	94,6722
4	1,7635	2,7433	96,7588
5	6,749	4,3877	90,8254
6	0,6786	6,4326	98,4577
7	7,7453	4,8716	99,0137
8	4,1259	8,9764	97,6749
9	8,7413	1,4588	95,8366
10	1,7437	3,6755	99,0149
Média	5,231	4,060	95,046
Desvio Padrão	4,052	2,282	3,979
<i>p</i> (ANOVA)	< 0,0001		

ANEXO

ANEXO

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA EM ANIMAIS



HOSPITAL E MATERNIDADE ANGELINA CARON

Coordenação de Ensino e Pesquisa

Campina Grande do Sul, 28 de julho de 2008

Parecer nº021/2008

De: Comissão de Ética e Pesquisa em Animais

Para: Dr. Gustavo M. Paul

Assunto: Parecer

1. **Título do projeto:**
Efeitos da imunossupressão na cicatrização de bexiga de ratos Wistar
2. **Relator:**
Dr. João Carlos Domingues Repka
3. **Animais a serem utilizados:**
30 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar
4. **Avaliação dos procedimentos previstos:**

Procedimentos	Avaliação / sugestão
Condições gerais do experimento	Satisfatórias de acordo com as orientações do COBEA.
Concepção ética do estudo	Satisfatória
Anestesia: Associação xilasina 10mg/kg e ketamina 100mg/kg sob forma de injeção intramuscular em região da coxa.	Satisfatório
Procedimento cirúrgico: em cada rato após a anestesia será procedida laparotomia mediana e cistotomia padronizadas seguidas de cistorráfia com fio de PDS 5-0 em dois planos. Em seguida sutura de aponeurose com fio de vycril 0 em sutura contínua e de pele com fio de nylon 3-0 incolor também de forma contínua. Após o procedimento os animais serão devolvidos a sua gaiolas.	Satisfatório
Analgesia e imunossupressão: analgésico dipirona 25mg/kg e imunossupressores Tacrolimus 0,1mg/kg e Micofenolato Mofetil 20mg/kg diários.	Satisfatório
Eutanásia e coleta de amostras: após 15 dias do procedimento os animais serão anestesiados com éter sulfúrico em sistema inalatório fechado e submetidos à punção intra cardíaca para coleta de amostras e exanguinação letal até a parada cardíaca. Após serão coletadas as amostras viscerais de bexiga por laparotomia,	Satisfatório
Biossegurança: serão respeitadas as normas de biossegurança previstas para manipulação de animais de laboratório. As carcaças serão removidas para o expurgo hospitalar e transportadas para o aterro sanitário de Curitiba.	Satisfatório
Observações a serem consideradas:	Somente poderão participar desse estudo experimental profissionais com experiência comprovada em experimentação animal. Para o descarte das carcaças, sugerimos envolver cada uma em sacos plásticos de lixo hospitalar, fechá-los de maneira hermética e solicitar ao setor de resíduos sólidos do hospital a sua coleta.

5. **Parecer final:**

Todos os procedimentos analisados pela Comissão de Ética em Pesquisa foram considerados satisfatórios, sendo este protocolo autorizado para sua execução nas dependências do centro de experimentação animal deste hospital

Dr. Pedro Ernesto Caron
Presidente da comissão de ética em pesquisa do HAC

